

**Příprava a charakterizace submikronových částic
ibuprofenu**

Preparation and characterization of submicron particles of
ibuprofen

Autor:

Bc. Tomáš Sosna

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Daniela Plachá Ph.D.

Ostrava 2017

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Univerzitní studijní programy
Centrum nanotechnologií

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Tomáš Sosna**
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie
Téma: **Příprava a charakterizace submikronových částic ibuprofenu**
Preparation and characterization of submicron particles of ibuprofen

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je příprava submikronových částic, případně nanočástic, ibuprofenu s využitím superkritické kapaliny a jejich charakterizace. Teoretická část bude zaměřena na využití superkritických kapalin pro mikronizaci léčiv, na studium vlivu teploty a tlaku superkritické kapaliny na morfologii a velikost vzniklých částic a metody testování vzniklých částic. V praktické části budou připraveny částice ibuprofenu s využitím komerčně dodávaného zařízení Spe-ed SFE-4, bude provedena charakterizace vzniklých částic metodami XRD, FTIR, PSD, SEM a provedeny testy rozpustnosti.

Seznam doporučené odborné literatury:


- R. Campardelli, L. Baldino, E. Reverchon. Supercritical fluids applications in nanomedicine, The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 101, 193-214.
- N. Esfandiari. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 100, 129-141.
- J. Du, X. Li, H. Zhao, Y. Zhou, L. Wang, S. Tian, Y. Wang. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 495, 2, 738-749.
- M. Türk, Particle Formation with Supercritical Fluids, 1st Edition, Elsevier, Oxford, 2014, 152 p., ISBN 9780444594860.
- M. Perrut, J. Jung, F. Leboeuf. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part I: Micronization of neat particles, International Journal of Pharmaceutics, 2005, 288, 1, 3-10.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

Datum zadání: 20.10.2016

Datum odevzdání: 15.05.2017



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.
prorektor pro studium



Místopřísežné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem celou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 15. 5. 2017

Podpis studenta:

.....

Prohlášení

- Byl jsem seznámen s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití školního díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla a §60 – školní dílo
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále VŠB – TUO) má právo nevýdělečné ke vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB – TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby.

V Ostravě 15. 5. 2017

.....

podpis studenta

Jméno a příjmení autora práce:

Bc. Tomáš Sosna

Adresa trvalého pobytu autora práce:

Gen. Sochora 1203, Ostrava - Poruba, 708 00



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Poděkování

Děkuji především paní doc. Ing. Danieli Plaché Ph.D. za poskytnuté konzultace a pomoc při přípravě mé diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům CNT VŠB-TUO za provedení analýz.

Abstrakt

Cílem diplomové práce je příprava submikronových částic, případně nanočástic, ibuprofenu s využitím superkritické kapaliny a jejich charakterizace. Teoretická část je zaměřena na využití superkritických kapalin pro mikronizaci léčiv, na studium vlivu teploty a tlaku superkritické kapaliny na morfologii a velikost vzniklých částic a metody testování vzniklých částic. V praktické části diplomové práce byly připraveny částice ibuprofenu s využitím komerčně dodávaného zařízení Spe-ed SFE-4, připravené částice byly charakterizovány metodami XRD, FTIR, PSD, SEM. Následně byl vyhodnocen vliv velikosti částic na rozpustnost ibuprofenu ve vodném prostředí a rovněž byl proveden test propustnosti testující změny v permeabilitě ibuprofenu v lidském organismu.

Abstrakt

Thesis is aimed to the preparation of submicron and/or nanoparticles, of ibuprofen using supercritical fluid and their characterization. Theoretical part is focused on application of supercritical fluids for micronization of drugs, on study of temperature and pressure influence of supercritical fluid on morphology and size of produced particles and methods of testing of produced particles. In practical part of the thesis ibuprofen particles were prepared with using of commercially available device Spe-ed SFE-4, characterization of prepared particles was performed by methods of XRD, FTIR, PSD, SEM. In addition solubility tests and test of permeability were used to evaluate influence of particle size on availability in human organisms.

SOSNA, Tomáš. *Příprava a charakterizace submikronových částic ibuprofenu*. Ostrava, 2017. Diplomová práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava. Univerzitní studijní programy

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek	10
1 Úvod.....	11
2 Léčiva.....	13
2.1 BCS.....	13
2.2 NSAID	14
2.3 Ibuprofen.....	14
2.3.1 Mechanismus účinku	15
2.4 Rozpustnost.....	16
2.4.1 Rozpustnost ibuprofenu	16
2.5 Rozpustnost v CO ₂	17
2.5.1 Rozpustnost ibuprofenu v CO ₂	17
2.6 Polymorfismus	17
2.6.1 Polymorfismus ibuprofenu	18
2.7 Modifikace ibuprofenu	19
2.8 Disoluční testy	19
2.8.1 Disoluční testy ibuprofenu	21
2.8.2 Stanovení koncentrace ibuprofenu	22
2.9 Propustnost.....	22
2.9.1 Stanovení propustnosti ibuprofenu.....	22
3 Superkritické tekutiny	24
3.1 Superkritické tekutiny.....	24
3.2 RESS.....	25
3.3 Parametry ovlivňující RESS proces.....	26
3.3.1 Tlak a teplota	26

3.3.2	Tvar trysky.....	26
3.4	Tvorba částic a růst	27
3.5	Příprava ibuprofenu metodou RESS.....	28
3.6	GAS/SAS	28
3.7	Příprava ibuprofenu metodou GAS/SAS.....	29
4	Příprava částic ibuprofenu.....	31
4.1	Přístrojové vybavení	31
4.2	Použité chemikálie	31
4.3	Přístroj SFE-4	31
4.4	Postup přípravy	32
4.5	Podmínky přípravy	33
4.6	Stanovení morfologie.....	34
4.7	Stanovení rozpustnosti.....	34
4.8	Stanovení propustnosti.....	35
5	Výsledky a diskuze	37
5.1	SEM	37
5.2	Velikost částic.....	39
5.3	XRD	42
5.4	FTIR.....	44
5.5	Rozpustnost.....	45
5.6	Propustnost.....	46
5.7	Využití kratší trysky.....	47
6	Závěr	50
7	Citovaná literatura.....	52

Seznam použitých symbolů a zkratek

CO₂ – oxid uhličitý

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GAS – metoda využívající anti-rozpouštědla v plynném stavu

NSAIDs – nesteroidní protizánětlivá léčiva

PSD – distribuce velikosti částic

PAMPA – zkouškou permeability paralelní umělou membránou

RESS – rychlá expanze superkritické směsi

SAS – metoda využívající superkritické anti-rozpouštědlo

scCO₂ – oxid uhličitý v superkritickém stavu

SCF – supekritická tekutina

SCFs – superkritické tekutiny

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

SFE-4 – přístroj Spe-ed SFE-4

XRD – rentgenová difrakční analýza

C_0 - počáteční koncentrace sloučeniny v donorové jamce (mg/dm³)

$C_A(t)$ - koncentrace sloučeniny v akceptorové jamce v čase t (mg/dm³)

$C_{equilibrium}$ – rovnovážná koncentrace (mg/dm³)

$C_D(t)$ - koncentrace sloučeniny v donorové jamce v čase t (mg/dm³)

A - filtrační plocha (cm²)

p_{app} - permeabilní koeficient

t - inkubační čas (s)

T - procentuální permeabilita (%)

V_A - objem akceptorové jamky (dm³)

V_D - objem donorové jamky (dm³)

1 Úvod

Většina farmaceutických látek se vyznačuje nízkou rozpustností ve vodě. Z tohoto důvodu je jejich biologická dostupnost v lidském organismu omezená a jejich dávky pro léčebné účely musí být vyšší, než je skutečná potřeba. Jednou z možných cest, jak zvýšit jejich rozpouštěcí rychlosti v organismu, je snížení velikosti jejich částic. Rozpustnost mikronizovaných částic se zvyšuje z důvodu většího aktivního povrchu při kontaktu s vodným prostředím. Výhodou tohoto přístupu zpracování léčiv je, že vede ke snížení jejich dávkování, a tudíž se snižuje celková zátěž organismu [1].

Konvenční metody snížení velikosti částic jsou sušení rozprašováním, tryskové mletí, sušení vymrazováním a rekrystalizace z roztoku. Tyto metody mají některé nevýhody, jako je široká distribuce velikosti částic, problémy znečištění životního prostředí z důvodu použití organických rozpouštědel nebo toxické dílčí kroky [1].

Možnou cestou k překonání těchto nevýhod je využití superkritických tekutin (SCFs). Výhodou SCFs je snadné ovlivnění jejich vlastností jednoduchou změnou provozního tlaku nebo teploty, což může vést k tvorbě částic s relativně úzkou distribucí jejich velikosti. Při přípravě částic s využitím SCFs nejsou ve většině postupů použita organická rozpouštědla. Výhoda využití CO₂ nebo vody v superkritickém stavu spočívá zejména v jejich netoxických vlastnostech, dobré dostupnosti a relativně nízké ceně [2].

Teoretická část diplomové práce popisuje základní rozdělení léčiv se zaměřením na nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs), zejména ibuprofen. Dále jsou představeny důležité parametry ovlivňující rozpustnost léčiv a závěrem jsou naznačeny způsoby a principy využití SCFs pro mikronizaci léčiv a parametry, které je ovlivňují. Pozornost je zejména věnována procesu rychlé expanze superkritické směsi (RESS), což je jeden z možných způsobů mikronizace léčiv pomocí SCFs.

Praktická část je věnována přípravě submikronových částic, příp. nanočástic, ibuprofenu pomocí metody RESS. Sledován je vliv teploty a tlaku na výslednou morfologii a velikost částic, které jsou charakterizovány pomocí metod, jako je skenovací elektronová mikroskopie (SEM), rentgenová difrakční analýza (XRD), infračervená mikroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), analýza distribuce velikosti částic (PSD), testy rozpustnosti s využitím ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a testy propustnosti zkouškou permeability paralelní umělou membránou (PAMPA).

Cílem diplomové práce je připravit submikronové částice ibuprofenu s využitím supekritického oxidu uhličitého (scCO_2). K této přípravě bude využit komerčně vyráběný přístroj Spe-ed SFE-4. Zvolenou metodou je rychlá expanze superkritické tekutiny (RESS). Dalším cílem je studium závislosti morfologie a velikosti vzniklých částic na změně tlaku a teploty supekritické tekutiny (SCF). Následně budou provedeny testy rozpustnosti a propustnosti vybraných připravených částic pro stanovení vlivu velikosti částic na biodostupnost ibuprofenu v organismu, a ty budou porovnány s původním vzorkem ibuprofenu. Rovněž bude sledován vliv délky výstupní trysky na velikost vzniklých částic.

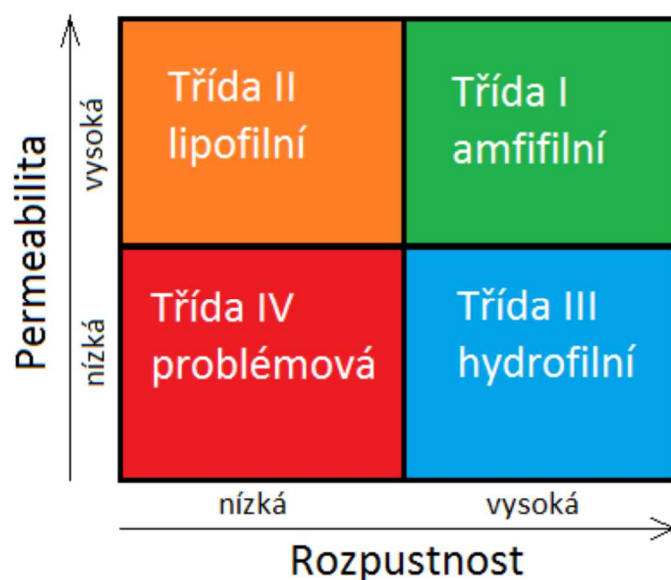
2 Léčiva

Tato část je zaměřena na rozdělení léčiv s důrazem na nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs), konkrétně na ibuprofen. Dále jsou představeny parametry, které ovlivňují rozpustnost léčiv, možné způsoby zvýšení rozpustnosti, a rovněž možnosti charakterizace vzniklých částic.

2.1 BCS

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS, Obrázek 1, Tabulka 1) je vědecká klasifikace léčiv na základě jejich rozpustnosti ve vodě a střevní propustnosti, která koreluje *in vitro* rozpouštění a *in vivo* biologickou dostupnost léčivých přípravků [3].

Léčivá látka je vysoce rozpustná, když se její nejvyšší léčebná dávka rozpustí ve 250 ml (nebo méně) vodného pufovacího roztoku při pH 1-7,5, a vysoce vstřebatelná (permeabilní), když se vstřebá v organismu nejméně z 90 %. Je nutné si uvědomit, že BCS je určité dvouparametrové zjednodušení složitého procesu absorpce látky, která je ovlivněna daleko více parametry, jako je její stabilita, vazba na plazmatické bílkoviny atd. [3] [4] [5].



Obrázek 1: Biofarmaceutický klasifikační systém [4].

Tabulka 1: Příklady léčiv zařazených do BCS [3].

BCS třída	Rozpustnost	Propustnost	Absorpční schopnost	Příklady
I	Vysoká	Vysoká	Dobře absorbován	Metoprolol, Diltiazem
II	Nízká	Vysoká	Dobře absorbován	Nifedipin, Ibuprofen
III	Vysoká	Nízká	Variabilní	Cimetidin, Captopril
IV	Nízká	Nízká	Špatně absorbován	Hydrochlorothiazid, Taxol

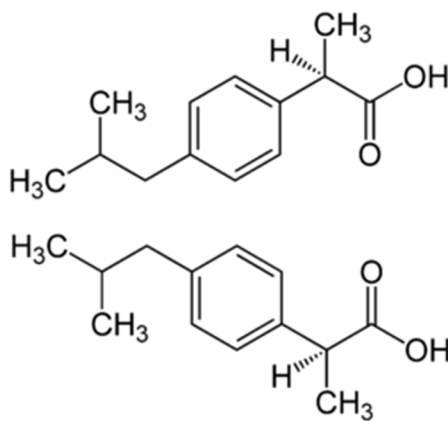
2.2 NSAID

Označení nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs) sahá do 60. let, kdy vznikla potřeba jejich oddělení od steroidních léčiv [6]. NSAIDs jsou používána k léčbě zánětlivých onemocnění, bolesti hlavy a bolesti spojené s nachlazením, chřipkou [7] nebo při léčbě osteoartritidy [8]. Patří mezi ně například aspirin, ibuprofen, ketoprofen, nabumeton nebo naproxen [7].

Podstatou protizánětlivého působení nesteroidních antirevmatik je inhibice syntézy prostaglandinů. V menší míře se uplatňují i další mechanismy. Protože prostaglandiny jsou spojeny s ovlivněním mnoha fyziologických funkcí, je inhibice jejich produkce spojena s výskytem řady nežádoucích účinků [9].

2.3 Ibuprofen

Ibuprofen (Obrázek 2, Tabulka 2) je z chemického hlediska (α)-(R,S)-2-(4-izobutylfenyl)propionová kyselina. Má centrum optické otáčivosti v α -pozici propionátové skupiny, proto existují dva enantiomery. (R)(-) izomer je podstatně méně farmakologicky aktivní než (S)(+) izomer, nazývaný dexibuprofen. Při *in vitro* testech v roce 1991 se zjistilo, že enzym 2-arylpropionyl-CoA-epimeráza konvertuje v organismu R-izomer na aktivní S-izomer. Kvůli vysokým nákladům a možné zbytečnosti výroby čistého S-izomeru je mnoho produktů vyráběno ve formě racemických směsí. Dexibuprofen byl poprvé patentován roku 1996 [10].



Obrázek 2: Strukturní vzorec ibuprofenu.

Tabulka 2: Vlastnosti ibuprofenu [11].

Sumární vzorec	Molární hmotnost	Teplota tání
$C_{13}H_{18}O_2$	206,28 g/mol	75–78 °C

Ibuprofen se používá k léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních chorob, mimokloubního revmatismu a chorob páteře. Jako analgetikum-antipyretikum ho lze využít při horečnatých stavech, nemocech z nachlazení, bolestech hlavy různého původu, bolestech zubů a bolestivé menstruaci [10] [11].

2.3.1 Mechanismus účinku

Po perorálním podání se ibuprofen rychle a dobře vstřebává a vrcholu plazmatické koncentrace při podání nalačno dosahuje již za 45 minut, zatímco při podání s jídlem cca za 1-3 hodiny. Po rektální aplikaci se ibuprofen vstřebává pomaleji, maximální koncentrace v séru je dosaženo až za 2 hodiny po aplikaci. Sérové koncentrace po podání 600 mg ibuprofenu rektálně po 4-6 hodinách po aplikaci odpovídají sérovým koncentracím 400 mg ibuprofenu podaného perorálně [11].

Ibuprofen se z více než 99 % váže na plazmatické proteiny. Tato vazba je reverzibilní. Léčivo je intenzivně metabolizováno v játrech cytochromy CYP2C8 a CYP2C9. Část (*R*)(-)-izomeru je ireverzibilně přeměněna na (*S*)(+) formu. Poměrně rychle je vylučován močí, hlavně ve formě metabolitů a jejich konjugátů a jen malá část je vylučována žlučí do stolice. Biologický poločas má asi 2 hodiny. Při snížení vylučování může dojít ke kumulaci léku v organismu. Exkrece ibuprofenu je ukončena za 24 hodin po podání poslední dávky. Biologická dostupnost je minimálně alterována přítomností stravy. Ibuprofen u žen prochází placentární bariérou a je vylučován do mateřského mléka [11].

2.4 Rozpustnost

Rozpustnost léčivé látky ve vodě je základní vlastnost, která hraje důležitou roli při absorpci léčiva po orálním podání. Upravuje možnost parenterálního podání léčiva a je užitečná při manipulaci a zkoušení vlastností léčiv v průběhu procesu navrhování a vývoje léčiv. Rozpustnost léčiva, ale také rychlost rozpouštění, při které se pevný lék nebo léčivo z dávkové formy dostává do roztoku, je důležitý parametr, který musí být sledován, zvláště, když je rychlost rozpouštění limitována [3].

2.4.1 Rozpustnost ibuprofenu

Ibuprofen je poměrně slabou kyselinou, jeho rozpustnost ve vodě nebo při kyselém pH je velmi malá (<1 mg/ml) a u mnoha autorů se liší v rozsahu od 21 mg/l [12] po 0,37 mg/ml [13]. To má za následek poměrně dlouhý čas spočívání léčiva v kyselém prostředí žaludku, což zpomaluje absorpci. Absorpce je klíčovým bodem ovlivňujícím dosažení terapeutických hladin v plazmě [10].

Ibuprofen je snadno rozpustný v acetonu, etheru, methanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů [14]. Přesný mechanismus rozpadu, rozpouštění a vstřebávání není zcela znám a je předmětem pokračujícího výzkumu. Ke vstřebávání většiny přijaté dávky pravděpodobně dochází v tenkém střevě. Jedna teorie říká, že větší částice rozpadající se ze standardní tablety ibuprofenu setrvávají v žaludku déle oproti jemným krystalkům pocházejícím z měkké želatinové kapsle [15].

Rozpustnost ibuprofenu je závislá na pH, s jehož vzrůstající hodnotou roste. Velice malá rozpustnost ibuprofenu ve vodě může vést k segregaci léčiva do mikrodomén a možné krystalizaci, která může ovlivnit uvolňovací profil a dokonce může vést k poškození membrány žaludku. Z toho důvodu se připravují například homopolymery a kopolymery N-ethylmorfolinu methakrylamidu (EMA) a N,N-dimethylakrylamidu (DMA) hydrogelů, které se využívají jako matrice pro uvolňování ibuprofenu, což vede k minimalizaci uvedených problémů. Hydrogely byly naplněny ibuprofenem a testovány při teplotě 37 °C a pH v rozmezí 2,5-7,4. Výsledky ukázaly, že DMA hydrogely většinu ibuprofenu uvolnily v nekystalické formě při pH 7,4, ale nebyly schopné zamezit krystalizaci při pH 2 a 5. Naproti tomu EMA hydrogely byly schopné zamezit krystalizaci při všech hodnotách pH [16].

2.5 *Rozpustnost v CO₂*

Podle klasické nukleační teorie nižší rozpustnost rozpouštěné látky, a proto vyšší rozředění binární směsi, vede k tvorbě menších částic. Snížení velikosti částic s poklesem rozpustnosti je dáno tím, že kolizní rychlost částic je přímo úměrná druhé mocnině koncentraci částic [2].

2.5.1 *Rozpustnost ibuprofenu v CO₂*

Výskyt konformerů ibuprofenu v scCO₂ byl sledován pro dvě izochory v teplotním rozsahu 35-90 °C využitím kombinace dat IR spektroskopie, kvantově chemických výpočtů a molekulární dynamické simulace. Výsledkem bylo potvrzení dvou spektrálních příspěvků spojených se dvěma konformery, které se liší hodnotami dihedrálních úhlů. Bylo zjištěno, že v rozsahu sledovaných teplot dominuje výskyt prvního konformeru. Zároveň při teplotě 60 °C byl jeho výskyt u obou izochor maximální [17].

Další možností určení rozpustnosti ibuprofenu v CO₂ jsou molekulární dynamické simulace, které byly použity k výpočtu solvatační volné energie ibuprofenu v CO₂ v rozsahu hustot spadajících do superkritických procesů. Za tímto účelem byly studovány tři modely pro CO₂, s názvy Zhang, EPM2 a TraPPE. Mezi těmito modely CO₂ však existují poměrně velké nesrovnalosti. První model je citlivý na rozdílné podíly disperzních a elektrostatických sil používaných v těchto modelech. Zvláště pro solvataci vysoce polární molekuly paracetamolu (s dipólovým momentem ~ 5,2 Debye) jsou tyto rozdíly výraznější než pro solvataci středně polární molekuly ibuprofenu (s dipólovým momentem ~ 1,6 D) [18].

2.6 *Polymorfismus*

Jev polymorfismu organických molekul, zejména v posledních dvaceti letech, výrazně ovlivnil farmaceutický vývoj, výzkum, výrobu a kontrolu, kde začal být podrobně monitorován. Polymorfismus je definován jako možnost molekuly (chemické entity) krystalovat, v závislosti na krystalizačních podmínkách, ve více krystalových strukturách, neboli polymorfech.

Pro farmaceutickou produkci je podstatné, že polymorfy se liší svými vlastnostmi, a to především rozpouštěcí rychlostí, v některých případech až o řád. Polymorfní přechody mohou proběhnout ve všech technologických stupních výroby léčiva, např. při finální krystalizaci léčivé látky, vlhké granulaci, mikronizaci, tabelaci nebo i v hotové tabletě,

např. působením pomocných látek, tzv. excipientů. Z tohoto důvodu je důležité sledovat stabilitu odpovídajících léčiv při všech těchto procesech [4].

V současnosti okolo 85 % produkce farmaceutických firem tvoří právě pevné lékové formy (tablety), a proto si žádný výrobce nemůže dovolit ignorovat problém polymorfismu u svých výrobků [4].

Existují dva hlavní typy polymorfismu. Prvním z nich je pakovací polymorfismus. Je charakterizován rozdílem v balení molekul v jednotkové buňce molekulárního krystalu. Ve skutečnosti není u tohoto druhu polymorfismu žádný rozdíl mezi konformací molekul tvořících krystalové mřížky různých polymorfů. Druhý typ polymorfismu je konformační. Ten je spojen s konformační mobilitou molekuly spojenou s vnitřní rotací určitých funkčních skupin a se specifickými intermolekulárními interakcemi [17].

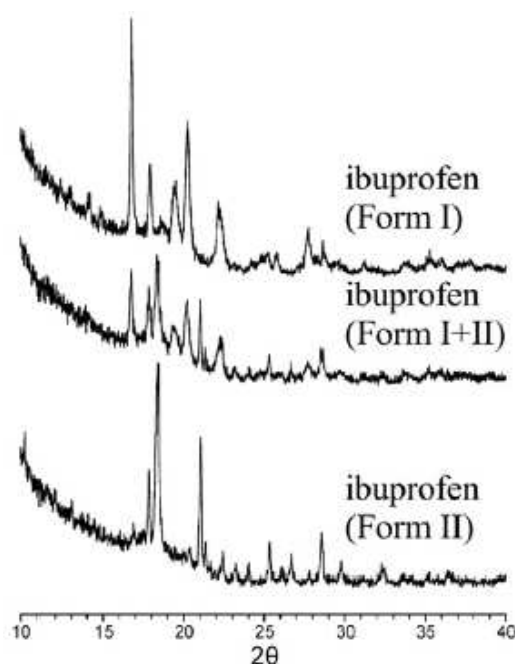
2.6.1 Polymorfismus ibuprofenu

Ibuprofen je jedním z léčiv, patřících k zástupcům představujícím konformační polymorfismus. Jako většina léčiv je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech, ale má velmi nízkou rozpustnost ve vodě a vodných roztocích, což vede k nízké biologické dostupnosti. Ibuprofen může existovat ve dvou polymorfních formách. Tyto polymorfy jsou charakterizovány dvěma konformacemi molekul, které se liší dihedrálními úhly a tvoří odpovídající krystalické struktury [17].

Podle studie využívající rentgenovou difrakci pro identifikaci krystalických fází a diferenční skenovací kalorimetrii byl sledován termodynamický vývoj forem ibuprofenu v závislosti na teplotě. Na základě zjištěných dat může ibuprofen existovat ve dvou různých krystalických fázích: v běžné fázi I, která taje při 349 K a v nové fázi II, která taje při 290 K. Srovnání entalpií obou forem a absence endotermní transformace vedla k závěru, že tyto dvě polymorfní varianty tvoří monotropický soubor: obvyklá fáze I je stabilní forma a fáze II je metastabilní. Objev této metastabilní formy, pravděpodobně s mnohem vyšší rozpustností, může vést k přípravě lékové formulace s výhodnějšími vlastnostmi [19].

Bylo rovněž popsáno, že hlavní rozdíly intenzity rentgenové difrakce prvního a druhého polymorfu ibuprofenu leží v úhlovém rozsahu 2θ od 15° do 25° (Obrázek 3). Tyto rozdíly jsou vyjádřeny v polohách píků a intenzitách jejich vrcholů. Pokud však dojde

k smísení obou polymorfů, a to zejména v případě, že množství prvního polymorfu dominuje, pak hlavní rozdíly jsou v redistribuci intenzit píků [17].



Obrázek 3: XRD záznamy polymorfních forem ibuprofenu [17].

2.7 Modifikace ibuprofenu

Pro zvýšení rozpustnosti je ibuprofen různě modifikován. Nejčastější možností je jeho převedení do formy solí, zejména sodných [20] [21], draselných, lyzinových nebo arginových [10]. Například ibuprofen lyzinát má vyšší rozpustnost než čistý ibuprofen, a tím může být sníženo jeho setrvání v žaludku a urychlen přechod do tenkého střeva [15].

Ve studii [22] byly provedeny experimenty s deponováním ibuprofenu do různých nosičů. Rozpouštěcí schopnost nezpracovaného ibuprofenu a ibuprofenu deponovaného do nosičů byla sledována při teplotě 310 K a pH 2 a 5,5. Výsledky studie ukázaly, že lze dosáhnout deponování léčiva do materiálů na bázi křemíku až do výše 50 hmotnostních %. Množství léčiva se zvyšovalo téměř lineárně se zvyšující se plochou silikátových materiálů. Studie rovněž ukázala, že nejvyšší rychlost rozpouštění byla dosažena u cyklodextrinu, a že rychlost uvolnění ibuprofenu rostla spolu s hodnotou pH [22].

2.8 Disoluční testy

Disoluční testy jsou prováděny v zařízeních, zvaných disoluční aparáty. Při disolučních testech se nejčastěji používá košíčková (USP 1) nebo pádelková aparatura,

kteře jsou doporučeny a standardizovány v kompediu U.S. Pharmacopeia (USP). Z technického hlediska lze disoluční aparát považovat za poměrně jednoduchý přístroj. Je však nutné si uvědomit, že požadavky na disoluční test přístroj splňuje pouze za předpokladu, kdy jsou jeho parametry (termostatování, vzdálenosti míchadel nebo košíčků od dna nádob, vycentrování hřídele atd.) dodrženy v rozsahu parametrů, předepsaných lékopisy. Parametry disolučního aparátu musí být v pravidelných intervalech testovány jednak ověřováním jejich skutečných hodnot na základě provádění odpovídajících měření a jednak prováděním disolučních testů s tzv. kalibračními tabletami (prednison a kyselina salicylová), u kterých je dán jak minimální, tak i maximální nalezený obsah léčivé látky [4].

Aparát s košíčky je tvořen termostatovanou disoluční nádobou, ve které je hřídel a košíček. Zkoušená léková forma se vkládá dovnitř košíčku, který se během disolučního testu otáčí. Aparát s košíčky se většinou používá pro disoluční test tobolek. Otáčky košíčku jsou voleny zpravidla v rozsahu otáček 50–100 ot./min [4].

Aparát s pádly je tvořen termostatovanou disoluční nádobou, ve které je rotující hřídel s míchadlem. Zkoušená léková forma se v tomto případě vnáší do disoluční nádoby. Otáčky míchadla jsou voleny zpravidla v rozsahu otáček 50–75 ot./min [4].

Nejběžnějším disolučním médiem je voda. Nicméně, vodné médium má kromě nesporných výhod i svá úskalí, kterými jsou především variabilita hodnoty pH použité vody i změna pH hodnoty a povrchového napětí během disoluce v závislosti na povaze látek, které se během disolučního testu rozpouštějí. V případě lékových forem, které jsou ve vodě málo rozpustné, je přípustné použít vhodný tenzid, jehož koncentrace by měla být experimentálně podložena [4].

Jako typická média se používají:

- voda
- kyselina chlorovodíková (0,1–0,001 mol.dm⁻³)
- octanové pufry
- fosfátové pufry
- roztoky polysorbátů
- roztoky dodecylsulfátu sodného (SDS)
- roztoky lauryldimethylamino-N-oxidu

- kombinace pufrů s tenzidy
- simulovaná žaludeční šťáva bez enzymu
- simulovaná intersticiální šťáva bez enzymu

Používaný objem média pro disoluční testy se pohybuje v rozmezí od 500 do 1000 ml, nejčastěji však 900 ml. Přesné podmínky pro již běžně používané farmaceutické substance definuje FDA na svých stránkách [4].

2.8.1 Disoluční testy ibuprofenu

Rozpustnost ibuprofenu je možné zjistit pomocí matematického modelování s využitím různých modelů. Modelování rozpustnosti solí ibuprofenu, jako je ibuprofen lysin, je však stále problém, neboť modelování rozpustnosti solí není zcela definováno [23]. Další možností zjištění rozpustnosti ibuprofenu nebo jeho solí je stanovení rozpustnosti experimentální cestou [24] [25].

Ve studii [24] byly testovány směsi ibuprofenu a ve vodě rozpustných makrogolů (polyethylenglykolů), konkrétně Makrogolu 4000 a 6000 v poměrech 1 : 0,5; 1 : 1 a 1 : 1,5. Rozpustnost uvedených směsí byla testována ve fosfátovém pufru (pH 7,2) a roztoku HCl (0,1 mol.dm⁻³). Bylo prokázáno, že makrogoly podstatně zvyšují rozpustnost ibuprofenu. U pevné směsi obsahující Makrogol 6000 v poměru 1 : 1,5 (lék : nosič) bylo potvrzeno rychlejší a vyšší uvolňování léčiva. Dále bylo zjištěno, že je směs v tomto poměru léku a nosiče je ze všech testovaných směsí v pevném stavu nejvíce účinná. Porovnání FTIR záznamů pevných směsí s čistým léčivem odhalilo, že sledované směsi byly stabilní. Jedná se o účinnou metodu, jak zvýšit rychlost rozpouštění ibuprofenu [24].

Studie srovnávající rozpustnost ibuprofenu ve formě suspenze a tablet prokázala větší rozpustnost v tabletách. Suspenze byla charakterizována na základě velikosti částic, hustoty a rozpustnosti. Testy rozpustnosti byly provedeny s použitím následujících médií: pufr o pH 7,2; 6,8; 4,5 a roztok HCl o koncentraci 0,1 mol.dm⁻³. Pro kvantitativní analýzu byla použita UV/VIS spektrofotometrie. Bylo zjištěno, že kinetické uvolňování ibuprofenu ze suspenze závisí na pH prostředí a bylo odlišné ve srovnání s profilem uvolňování z tablet za stejných experimentálních podmínek. Nejpomaleji probíhalo uvolňování ibuprofenu při pH 1,0 [25].

2.8.2 Stanovení koncentrace ibuprofenu

Ke stanovení ibuprofenu v roztoku se využívá vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC). Tato metoda byla validována ve smyslu přesnosti, preciznosti, linearity a v limitech detekce a kvantity. Jako mobilní fáze se využívá např. roztok fosfátového pufru a acetonitrilu [26].

2.9 Propustnost

Důležitým fyziologickým faktorem, který hraje hlavní roli při absorpci léčiva po ústním podání je propustnost skrze gastrointestinální membránu. Transcelulární permeabilita lipofilních substancí je závislá na rozpustnosti v lipidových vrstvách gastrointestinální membrány a její rozpustnost ve vodném prostředí [27]. Jednou z rychlých a jednoduchých *in vitro* technik, které dokáží odhadnout pasivní propustnost, je zkouška permeability paralelní umělou membránou (PAMPA), jejíž detailnější popis je proveden v praktické části této diplomové práce.

Tato technika používá umělou membránu, která napodobuje pasivní transcelulární transport z donoru (pufrovací roztok testovaných sloučenin) do akceptoru (pufrovací roztok). Většina léků je primárně nebo částečně absorbována pasivním transportem, avšak rychlost průniku v PAMPA testu poskytuje dobrou indikaci absorpčního potenciálu léku. Test PAMPA se používá ve farmaceutickém průmyslu k určení permeabilních vlastností molekul v počátečních stádiích zjišťování vlastností léčivých látek [28].

2.9.1 Stanovení propustnosti ibuprofenu

Propustnost ibuprofenu byla zkoumána *in vitro* na modelech lidské a prasečí tkáně, PAMPA testu a silikonové membráně. V modelech byly provedeny studie s použitím komerčních přípravků ibuprofenu a jednoduchých roztoků ibuprofenu. Permeační studie byly provedeny po dobu 6 hodin. Kumulativní množství permeátu v uvedeném časovém rozmezí bylo v rozmezí od 91 do 136 mg/cm². Výsledky ukázaly větší propustnost ibuprofenu u modelů PAMPA, silikonové membrány a prasečí tkáně v porovnání s lidskou kůží. [29].

Model PAMPA byl experimentálně využit pro sledování permeability cimetidinu v pufrovaném fyziologickém roztoku o pH 7,4 [30]. Vzorky cimetidinu o různé velikosti částic byly připraveny v koncentracích v rozmezí od 16 µg / ml do 648 µg / ml. 300 µl každého roztoku bylo aplikováno do donorových jamek modelu PAMPA. Akceptorové

jamky byly naplněny 200 μ l fyziologického roztoku fosfátového pufru. Poměr koncentrace permeátu k počáteční koncentraci původního, nijak nezpracovaného cimetidinu byl 0,014, zatímco poměr nanočástic cimetidinu byl 0,144. To znamená, že aplikace nanočástic vedla ke zvýšení permeability cimetidinu přibližně 10krát [30].

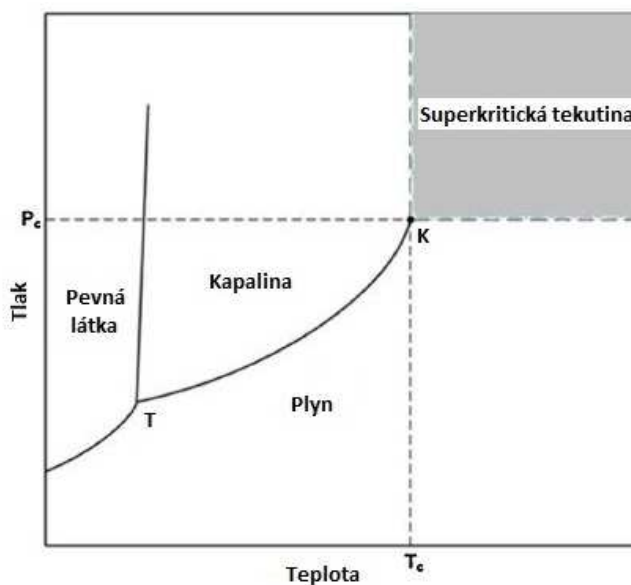
Ve studii [28] byla navržena predikce gastrointestinální absorpce třinácti nově syntetizovaných β -hydroxy- β -arylalkanových kyselin (HAA) a porovnána s absorpcí ibuprofenu. Pro provedení testů byl použit PAMPA test. Testování bylo prováděno za použití fosfátového pufru o pH 5,5. Systém byl inkubován po dobu 17 hodin při laboratorní teplotě. Ukázalo se, že všechny testované HAA měly nižší procento propustnosti T a koeficient propustnosti p_{app} než ibuprofen ($T = 45,37 \%$, $p_{app} = 20,92 \cdot 10^{-6}$), což potvrzuje, že tyto sloučeniny by měly mít nižší gastrointestinální absorpci než ibuprofen [28].

3 Superkritické tekutiny

V této části jsou popsány vlastnosti superkritických tekutin, popis procesu rychlé expanze superkritické směsi (RESS) a parametry procesu, které mohou ovlivňovat vlastnosti výsledných částic. Obecné poznatky jsou dány do kontextu s aktuálními výsledky dosaženými při přípravě částic ibuprofenu. Závěrem je popsána metoda využívající tzv. anti-rozpouštědlo, která je vhodná pro přípravu částic ibuprofenových solí.

3.1 Superkritické tekutiny

Superkritické tekutiny (SCFs) jsou ve fázovém p-T diagramu (Obrázek 4) v oblasti nad kritickým bodem, který zakončuje křivku značící rozhraní mezi kapalinou a plynem. Nejpoužívanější SCF je CO_2 , z důvodu jeho velice nízkých kritických hodnot. Navíc je netoxický, nehořlavý a levný. Ze stejného důvodu je používána i voda, avšak s tím omezením, že dosahuje podstatně vyšších kritických hodnot.



Obrázek 4: Fázový diagram CO_2 .

SCFs nabízí širokou škálu výhod v porovnání s tekutými organickými rozpouštědly. Z tabulky 3 je patrné, že SCFs jsou charakterizovány podobnou hustotou, jakou mají kapaliny, avšak jejich viskozita a difuzivita leží mezi kapalinami a plyny. To je činí atraktivními rozpouštědly pro separaci a reakce [2].

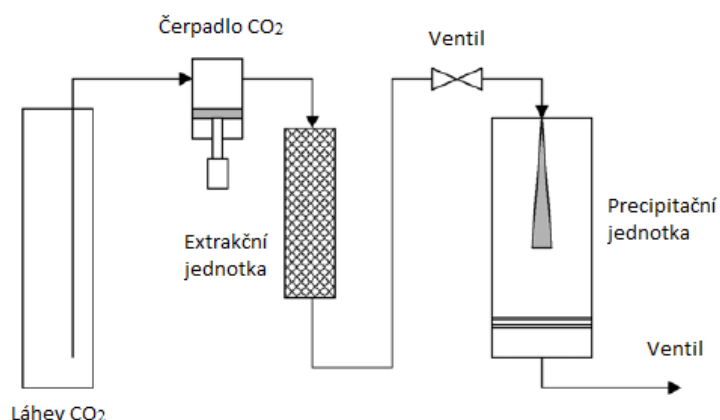
Tabulka 3: Řádové vlastnosti plynů, SCF a kapalin [2].

	Jednotka	Plyn	SCF	Kapalina
Hustota	kg/m ³	1	$5 \cdot 10^2$	10^3
Viskozita	Pa · s	10^{-5}	$10^{-4} - 10^{-5}$	10^{-3}
Difuzivita	cm ² /s	10^{-1}	$10^{-3} - 10^{-4}$	10^{-6}
Kinematická viskozita	cm ² /s	10^{-5}	$10^{-7} - 10^{-8}$	1

3.2 RESS

Proces rychlé expanze superkritické směsi (RESS, Obrázek 5) se sestává z dvou kroků. Prvním je extrakce, při které je superkritická tekutina saturována požadovanou látkou. Po extrakci následuje náhlé odtlakování skrz restriční trysku, což způsobuje snížení solvatační síly a teploty tekutiny vedoucí k precipitaci částic [2].

Snížení solvatační síly SCF způsobené odtlakováním vede k přesycení v rozsahu, které je řádově 10^5 - 10^6 . Toto přesycení je vytvořeno mechanickým rozrušením, které se šíří rychlostí zvuku, obvykle v časovém měřítku 10^{-6} - 10^{-4} s. Z toho důvodu tento proces umožňuje dosáhnout extrémně vysokého přesycení, které je velmi rychlé a homogenní v celé tekutině a vede k formování malých částic s úzkou distribucí jejich velikosti. Tento proces může být zároveň prováděn za mírných teplot (typicky pod 80°C), takže je vhodný pro zpracování termolabilních produktů, navíc bez použití organických rozpouštědel. Nevýhodou však je, že tento proces je vhodný pouze pro látky, které jsou relativně vysoce rozpustné v použité SCF, hlavně nepolární nebo těkavé polární látky, jako jsou alkoholy nebo estery. Zatímco nerozpustné látky, jako jsou kyseliny a soli nemohou být zpracovány. Tento nedostatek může být řešen použitím tzv. kosolventu, čím však přichází o výhodu eliminace organických rozpouštědel [31].



Obrázek 5: Schéma metody RESS [31].

3.3 Parametry ovlivňující RESS proces

Výslednou strukturu částic vzniklých metodou RESS ovlivňuje mnoho parametrů. Patří mezi ně teplota, tlak, tvar trysky, doba statické nebo dynamické fáze a teplota na výstupu.

3.3.1 Tlak a teplota

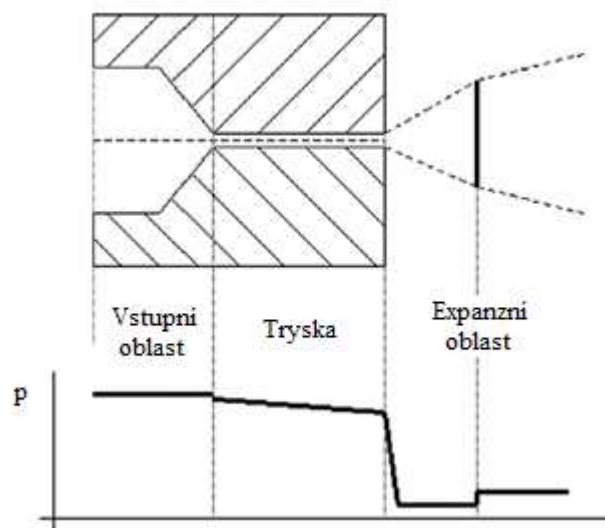
Obecně platí, že při stálém tlaku a zvyšování teploty se snižuje hmotnostní průtok CO₂ a rezidenční čas v expanzní cele, což vede často ke tvorbě větších částic [2].

Při zvětšování tlaku za konstantní teploty se zvětšuje hmotnostní průtok CO₂ skrz výstupní trysku. V důsledku toho se snižuje rezidenční čas látky v expanzní cele a snižuje se čas umožňující růst částic. Výsledkem je vznik menších částic [2].

Ibuprofen byl mikronizován metodou RESS ve studii [32], kdy byla sledována závislost velikosti vzniklých částic na tlaku (130-170 bar), teplotě (76-104 °C), délce kapiláry (8-12 mm), tryskací vzdálenosti („spray-distance“ - 20-60 mm) a kolizního úhlu (45 a 90 °). Byly připraveny částice o velikosti mezi 2,85 μm (± 0,31) a 7,48 μm (± 0,54) v závislosti na podmínkách. Nebyla zjištěna závislost velikosti částic na tlaku, avšak při větší tryskací vzdálenosti se zvětšovala velikost částic. Naopak při vyšší teplotě, délce kapiláry a většímu koliznímu úhlu byla velikost částic snížena [32].

3.3.2 Tvar trysky

Dalším klíčovým parametrem procesu je návrh trysky, která určuje mechaniku tekutin procesu a časové měřítko, v němž při vzniku dochází k podtlaku. Existuje mnoho modelů RESS procesu zabývajících se studiem expanze v trysce. Až na několik málo výjimek jsou tyto modely jednorozměrné. Pro úplný popis jsou zavedeny tři různé oblasti: vstupní oblasti trysky, oblast samotné trysky a expanzní oblast (Obrázek 6). Poměr mezi předexpanzním a expanzním tlakem je obvykle velmi [31].



Obrázek 6: Schéma trysky při metodě RESS přibližným tlakovým profilem [31].

Obecně můžeme říct, že za konstantní teploty a tlaku se při větším průměru trysky zvětšuje i hmotnostní průtok CO_2 , což vede ke snížení rezidenční doby a vede k tvorbě menších částic [2].

To se ovšem nepotvrdilo ve studii [33], kdy byly připraveny submikronové částice ibuprofenu ($0,88\text{--}6,72\ \mu\text{m}$) při různých rozměrech trysky, a to o průměru $0,45\text{--}1,7\ \text{mm}$ a délkách $2\text{--}15\ \text{mm}$. Tlak ($170\ \text{bar}$), teplota ($40\ ^\circ\text{C}$) tryskací vzrálénost byly konstantní. Zvětšení průměru i délky trysky vedl ke vzniku větších částic [33].

3.4 Tvorba částic a růst

Pro charakterizaci tvorby částic v procesu RESS, Debenedetti a Türk upravili klasickou teorii homogenní nukleace s ohledem na velmi neideální chování superkritických tekutin [31]. To se provádí tím, že mění definici přesycení zahrnutím termodynamického korekčního faktoru S :

$$S = \frac{y\phi(T, P, y)}{y_{\text{eq}}\phi(T, P, y_{\text{eq}})}, \quad (1)$$

kde $y\Phi(T, P, y)$ molární frakce rozpouštěné látky za dané extrakční teploty a tlaku, $y_{\text{eq}}(T, P, y_{\text{eq}})$ je rovnovážná molární frakce rozpouštěné látky za teploty a tlaku během expanze $y_{\text{eq}}(T, P, y_{\text{eq}})$ a Φ jsou příslušné koeficienty fugacity v reálné směsi. Tato teorie umožňuje vypočítat rychlost nukleace jako funkci modifikovaného přesycení a

mezifázového napětí mezi pevnou látkou a kapalinou σ . Druhý parametr uvedeného vztahu je zřídka známý a obvykle je jedinou alternativou jeho velikost odhadovat. Důvod nedostatku informací o této fyzikální vlastnosti je jedním z hlavních limitujících faktorů pro vývoj kvantitativních modelů [2][31].

3.5 Příprava ibuprofenu metodou RESS

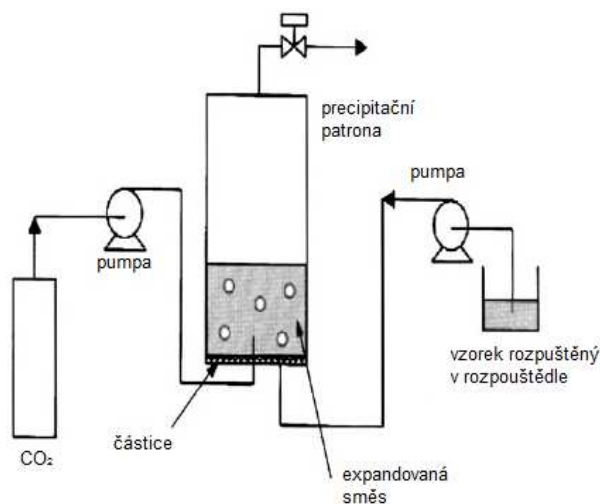
Ve studii [17] bylo zjištěno, že za termodynamických podmínek metody RESS se ibuprofen nacházel ve spodní části reaktoru a vyskytoval se v amorfním stavu. Superkritická tekutina byla z roztoku odváděna výstupem v horní části reaktoru a původní forma ibuprofenu tak nebyla strhávána jejím průtokem. Z toho vyplynulo, že v precipitační cele krystalizoval pouze ibuprofen rozpuštěný v scCO_2 .

Metodou RESS byly připraveny nanočástice ibuprofenu o velikosti pod 10 nm při tlaku 325 bar a teplotě 40 °C. Nanočástice byly shromažďovány do kapalného dusíku a následně sublimovaly v deionizované vodě s různým množstvím různých surfaktantů (PEI, PVP, Tween 40). Výsledné produkty byly ve formě filmu o velikosti částic pod 10 nm [34].

3.6 GAS/SAS

Druhým možným postupem přípravy částic ibuprofenu je metoda GAS (Obrázek 7), při které je precipitační patrona naplněna určitým množstvím připravované látky rozpuštěné v kapalném rozpouštědle. Následně je přidána SCF, která plní pozici tzv. anti-rozpouštědla.

Hlavní výhodou GAS metody je schopnost mikronizace polárních látek a získání mikrokapslí. Nevýhodou je použití organických rozpouštědel, jejichž stopy se mohou ve vzniklých částicích vyskytovat. Metoda SAS je obdobou GAS, liší se pouze v tom, že precipitační patrona je nejdříve naplněna SCF a následně je do ní vpuštěna připravovaná látka rozpuštěná v rozpouštědle [35].



Obrázek 7: Schéma metody GAS/SAS [35].

3.7 Příprava ibuprofenu metodou GAS/SAS

Samotný ibuprofen je v CO_2 dobře rozpustný, proto je pro mikronizaci jeho částic vhodná metoda RESS. Avšak jeho soli jsou v CO_2 méně rozpustné, proto je pro jejich přípravu vhodná metoda GAS/SAS.

Sodná sůl ibuprofenu byla mikronizována metodou SAS za použití acetonu jako rozpouštědla. Byly sledovány různé teploty (35, 45 a 55 °C), tlaky (80, 110 a 140 bar), průtok rozpouštědla (1, 2 a 3 ml/min), koncentrace ibuprofenu (0,5; 1 a 1,5 mg/ml) za konstantního průtoku CO_2 (1 kg/h). Částice dosahovaly velikosti 380 ± 84 nm, přičemž nejmenší a nejvíce krystalické byly při koncentraci ibuprofenu 0,5 a 1 mg/ml, koncentraci rozpouštědla 1 ml/min, tlaku 110 bar a 35 °C [20].

Mikročástice sodné soli ibuprofenu byly připraveny metodou precipitace se stlačeným anti-rozpouštědlem (PCA), v tomto případě ethanolem. Při tomto výzkumu bylo zjištěno, že se vzrůstající teplotou rostla i průměrná velikost částic a při vyšší koncentraci ibuprofenu v rozpouštědle se zvyšovala i velikost částic. Dále bylo zjištěno, že větší aglomeráty částic měly sníženou krystalinitu. Závěrem bylo potvrzeno, že s klesající velikostí částic rostla rozpouštěcí rychlost [21].

Dále byla úspěšně provedena metoda pro koprecipitaci ibuprofenu s poly(1-kyselinou mléčnou) a akrylátového kopolymeru EudragitL100 metodou SAS. Velikost částic byla snížena na mikrometry, a téměř se blížila k oblasti nanometrů. Morfologie částic se po zpracování změnila na sférickou, jak pro částice poly(1-mléčnák kyseliny)/ibuprofenu,

tak pro částice eudragitu/ibuprofenu. Částice na bázi eudragitu byly výrazně menší než částice na bázi poly(1-mléčné kyseliny). Profily uvolňování ibuprofenu byly určeny pro simulované žaludeční a střevní tekutiny, aby byl zjištěn účinek polymeru a byly identifikovány vhodné systémy pro různé způsoby podávání. Profily uvolňování *in vitro* pro polymerní/lékové systémy vykazovaly pomalejší a řízené uvolňování ve srovnání s nezpracovaným ibuprofenem. Navíc byly vyhodnoceny účinky tlaku, teploty, počáteční koncentrace roztoku a léčiva na polymeraci, na velikost částic a morfologii těchto léčivo/polymerních systémů. Podle údajů XRD, DSC a FTIR nedochází k fyzikálně chemickým interakcím mezi ibuprofenem a polymery a část molekul ibuprofenu pravděpodobně zůstává na povrchu [36].

4 Příprava částic ibuprofenu

4.1 Přístrojové vybavení

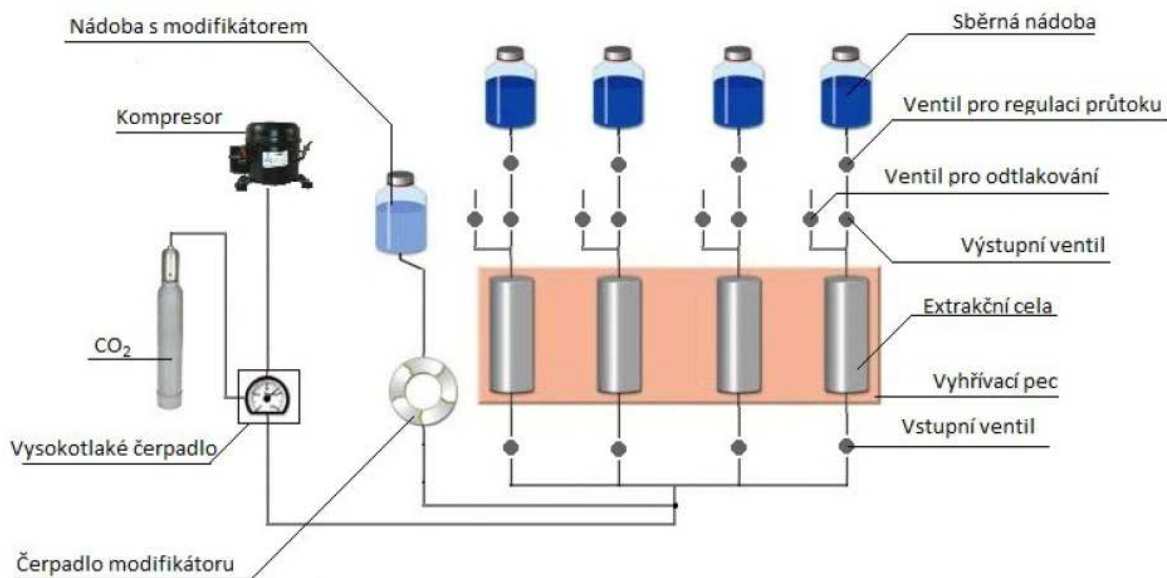
- Spe-ed SFE-4 – Applied Separation, USA
- SEM – Quanta FEG 450
 - o EDS detektor APPOLO X (EDAX)
 - o EBSD HIKARI kamera (EDAX)
 - o ETD detektor pro SE
 - o 4-segmentový BSE detektor
 - o zařízení spadá pod působnost RMTVC – Regionálně materiálově technické výzkumné centrum (<http://rmtvc.fmmi.vsb.cz/>)
- FTIR NICOLET 6700 Thermo USA
- XRD – Rigaku Ultima IV
- PSD – Horiba, Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950
- UPLC – Acquity I Class, WATERS
- Termoblok Digital Dry Bath Heater, DKT200-2, Hangzhou MIU Instruments Co., Ltd.
- PAMPA - BD Gentest

4.2 Použité chemikálie

- Ibuprofen (4-Isobutyl- α -methylphenylacetic acid, 99%, Alfa Aesar)
- CO₂ 4,8 (SIAD, Czech spol. s.r.o)
- KH₂PO₄ (Lachema a.s.)
- H₃PO₄
- Acetonitril (Sigma Aldrich)
- Demineralizovaná voda

4.3 Přístroj SFE-4

Pro mikronizaci částic byl využit přístroj Spe-ed SFE-4 (dále SFE-4, Obrázek 8). Tento přístroj je primárně určen k extrakcím látek z různých matric (vzorky životního prostředí, potravinářství, polymerní materiály). Přístroj využívá jako superkritickou tekutinu CO₂ [35].



Obrázek 8: Schéma přístroje Spe-ed SFE-4 [35].

4.4 Postup přípravy

Příprava vzorků pomocí přístroje Spe-ed SFE-4 se sestávala z těchto kroků:

- Plnění patron – patrona byla nejdříve uzavřena z jednoho konce šroubovatelnou hlavicí. Tento konec je vhodné označit, protože je do pece vkládán směrem nahoru. Do patrony byl následně vložen kousek skelné vaty, který se musí upéčovat pomocí pýchovací tyče. Následně byl vložen vzorek. Zbývající prostor byl vyplněn skleněnými kuličkami o průměru 1,5 mm. Dále byl vložen další kousek skelné vaty, který je nutno opět upéčovat. Nakonec byla patrona uzavřena z druhé strany druhou šroubovatelnou hlavicí. Poté byla vložena do vyhřívací pece do příslušné pozice. Schéma naplněné patrony před uzavřením její druhé strany je na obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma naplněné patrony [35].

- Vložení patron do zahřívací pece a zahřátí na zvolenou teplotu
- Vpuštění CO₂ do patron pod zvoleným tlakem
- Podrobení vzorku statickému režimu SFE po zvolenou dobu k jeho homogenizaci uvnitř patrony
- Dokončení procesu dynamickým režimem SFE po zvolenou dobu s jímáním do precipitačních vialek
- Odebrání a analýza připravených vzorků

4.5 Podmínky přípravy

Do patrony bylo vloženo vždy 0,2 g vzorku ibuprofenu (Tabulka 4, IbuPuv). Toto množství bylo zvoleno z důvodu optimální výtěžnosti procesu.

Byl zkoumán vliv teploty a tlaku na výslednou velikost částic (Tabulka 4, Ibu1-Ibu6). Pro sledování vlivu teploty byly zvoleny hodnoty 35 °C a 40 °C. Teplota výstupních ventilů byla nastavena na 60 °C. Teplota výstupních ventilů byla vyšší než teplota pece z důvodu jejich zamrzání při náhlé změně tlaku, což je přirozeným jevem [31]. Sledování vlivu tlaku bylo provedeno při tlacích o velikosti 200, 250 a 300 bar.

Statická fáze byla stanovena na 60 min, což je dostatečná doba pro homogenizaci směsi v patroně [32]. Doba dynamické fáze byla 5 min, neboť po delší době již z trysky neproudily žádné částice nebo naopak došlo k ucpání ventilů. Průtok CO₂ se pohyboval přibližně kolem 3 l/min, avšak tento údaj není zcela přesný z důvodu nepřesného průtokoměru, který je součástí aparatury.

Délka výstupní trysky byla 6 cm. Avšak byla vyrobena a použita i tryska délky 4 cm. Pro testování vlivu kratší trysky na velikost částic byla použita teplota v peci 35 °C, teplota na výstupu 60 °C a tlak 250 bar (Tabulka 4, IbuTryska). Částice byly poté charakterizovány prozatím jen morfologicky a jejich další analýza bude předmětem budoucí práce.

Tabulka 4: Značení vzorků.

Vzorek	IbuPuv	Ibu1	Ibu2	Ibu3	Ibu4	Ibu5	Ibu6	IbuTryska
Teplota (°C)	-	35	35	35	40	40	40	35
Tlak (bar)	-	200	250	300	200	250	300	250

4.6 Stanovení morfologie

Morfologie výsledných částic byla stanovena na základě snímků skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Velikost částic byla stanovena analyzátozem distribuce velikosti částic (PSD) a porovnána se snímkem SEM. Krystalová struktura byla stanovena rentgenovou difrakční analýzou (XRD). Vazebná struktura byla stanovena infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR).

4.7 Stanovení rozpustnosti

Částice původního ibuprofenu (IbuPuv) a ibuprofenu připraveného při teplotě 35 °C a tlaku 250 bar (Ibu2) byly rozpuštěny (Tabulka 5) ve fosfátovém pufru o pH 6,8 a 7,2. Pufr byl připraven v těchto krocích:

- Navážka 1,75 g K_2HPO_4 byla kvantitativně převedena do 900 ml demineralizované vody
- Úprava na požadované pH $\pm 0,1$ byla provedena zředěnou H_3PO_4
- Objem byl následně doplněn do 1 l
- Pufrovací roztok byl přefiltrován zařízením pro vakuovou filtraci Millipore s filtrem Millipore HAWP04700 o velikosti pórů 0,45 μm

Roztoky ibuprofenu v pufrovacím roztoku byly umístěny do termobloku, který byl vyhříván na teplotu 37 °C. Alikvótní podíly vzorků byly odebrány v časových intervalech 20, 40 a 60 min a koncentrace ibuprofenu byla stanovována metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). Jako mobilní fáze byla použita směs obsahující fosfátový pufr o pH 6,8 připravený postupem popsaným výše, a acetonitril v poměru 65 : 35. Pro separaci byla použita kolona BEH Shield RP18 1,7 μm 2.1 x 100 mm. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min v isokratickém režimu s délkou analýzy 6 min. Nastříkované roztoky byly před každou analýzou filtrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,22 μm . Teplota systému byla udržována při konstantní hodnotě 30 °C. Detekce byla provedena při vlnové délce 210-350 nm a pro kvantifikaci ibuprofenu byla použita vlnová délka 222 nm.

Tabulka 5: Koncentrace vzorků při úplném rozpuštění.

pH	6,8		7,2	
Vzorek	IbuPuv	Ibu2	IbuPuv	Ibu2
Koncentrace (mg/dm ³)	114,375	110,625	112,500	114,375

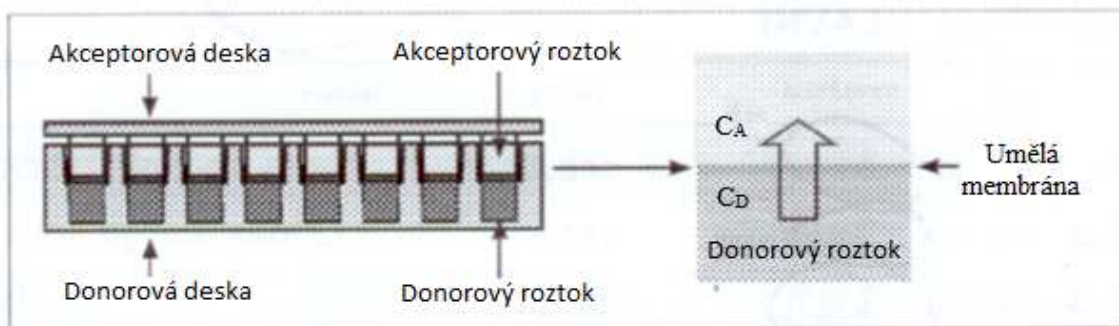
4.8 Stanovení propustnosti

Ke stanovení propustnosti připravených částic ibuprofenu se používá zkouška permeability paralelní umělou membránou (PAMPA). K určení propustnosti byla využita PAMPA (Obrázek 10), která se skládá z 96 poziční donorové a akceptorové desky. Tato PAMPA má trojvrstvou lipid/olej/lipid umělou membránu.

Při testech byl původní vzorek (IbuPuv) porovnán s vybranými připravenými vzorky. Jednalo se o vzorky připravené při teplotě tlaku 200 bar a teplotě 35 °C (Ibu1) a při tlaku 250 bar a teplotách 35 °C a 40 °C (Ibu2, Ibu5). Vstupní roztoky ibuprofenu ve fosfátovém pufru (pH 6,8) byly připraveny v rozmezí koncentrací 10-40 mg/dm³. Pro ověření koncentrace ibuprofenu ve vstupních roztocích byla provedena UPLC analýza postupem uvedeným v kapitole 4.7.

Propustnost za použití systému PAMPA byla stanovena následujícím postupem:

1. Před použitím byl systém PAMPA kondicionován při laboratorní teplotě po dobu alespoň 30 minut.
2. Následně bylo přidáno 300 µl sledovaných vstupních roztoků ibuprofenu ve fosfátovém pufru do jamek donorové desky a 200 µl fosfátového pufru bez ibuprofenu do každé jamky akceptorové desky.
3. Poté byla opatrně pomalým snižováním položena akceptorová deska na donorovou desku.
4. Celá sestava byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 hodin.
5. Po uplynulé době byly desky odděleny. Koncentrace ibuprofenu v roztocích jamek akceptoru a donoru byly stanoveny UPLC postupem popsáným v kapitole 4.7.



Obrázek 10: Experimentální nastavení PAMPY.

Pro analýzu dat byly použity následující vztahy:

Permeabilita (v jednotce cm/s):

$$P_e = \frac{-\ln[1 - C_A(t)/C_{equilibrium}]}{A \cdot (1/V_D + 1/V_A) \cdot t} \quad (2)$$

Retenční hmota:

$$R = 1 - [C_D(t) \cdot V_D + C_A(t) \cdot V_A]/(C_0 \cdot V_D) \quad (3)$$

kde:

C_0 - počáteční koncentrace sloučeniny v donorové jamce (mg/dm³)

$C_D(t)$ - koncentrace sloučeniny v donorové jamce v čase t (mg/dm³)

$C_A(t)$ - koncentrace sloučeniny v akceptorové jamce v čase t (mg/dm³)

V_D - objem donorové jamky = 0,3 ml

V_A - objem akceptorové jamky = 0,2 ml

$$C_{equilibrium} = [C_D(t) \cdot V_D + C_A(t) \cdot V_A]/(V_D + V_A) \quad (4)$$

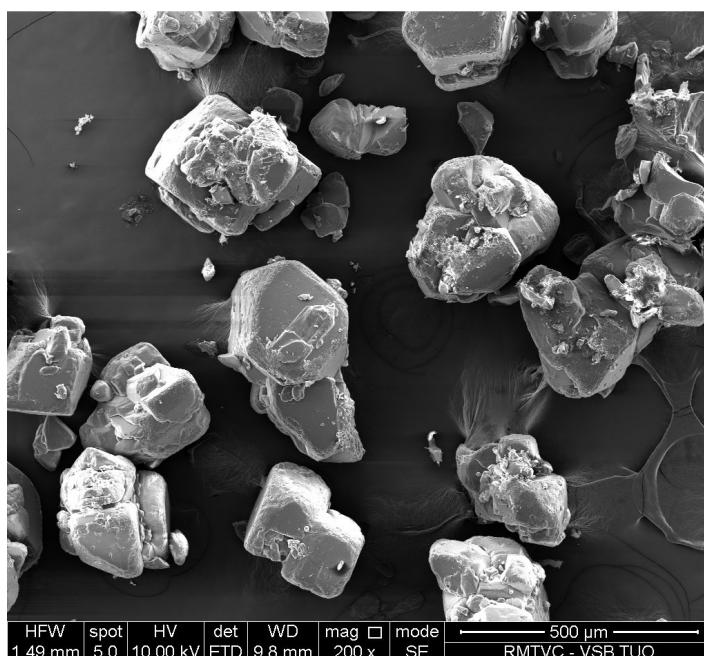
A - filtrační plocha = 0,3 cm²

t - inkubační čas = 18000 s (= 5 hod)

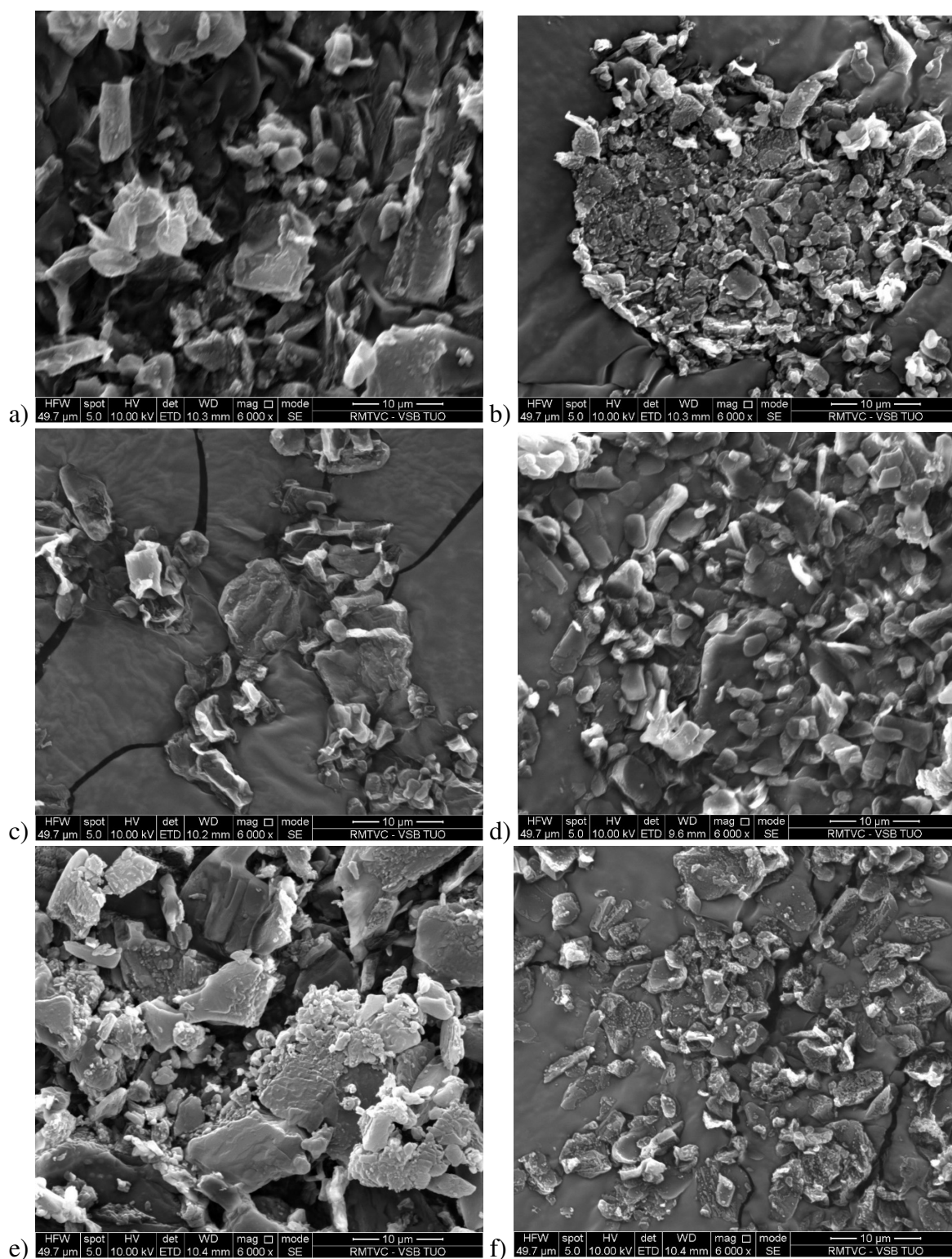
5 Výsledky a diskuze

5.1 SEM

Původní vzorek ibuprofenu (Obrázek 11) tvořil trojdimenzionální částice nepravidelných tvarů s velikostí kolem 200 μm . Na dalších snímcích SEM (Obrázek 12) jsou připravené částice ibuprofenu pomocí superkritického CO_2 při různé teplotě a tlaku. Na všech snímcích je patrné zmenšení připravených částic oproti původnímu vzorku. Vzniklé částice mají velikost pod 10 μm a mají různý tvar. Výjimkou jsou částice připravené při tlaku 250 bar a 40 $^{\circ}\text{C}$ (Obrázek 12e), které tvoří větší celky. Snímky SEM byly porovnány s výsledky měření metodou stanovení distribuce velikosti částic.



Obrázek 11: Původní vzorek ibuprofenu.



Obrázek 12: SEM snímky ibuprofenu připraveného při teplotě 35 °C a tlaku a) 200 bar, b) 250 bar, c) 300 bar; a při teplotě 40 °C a tlaku d) 200 bar e) 250 bar, f) 300 bar

5.2 Velikost částic

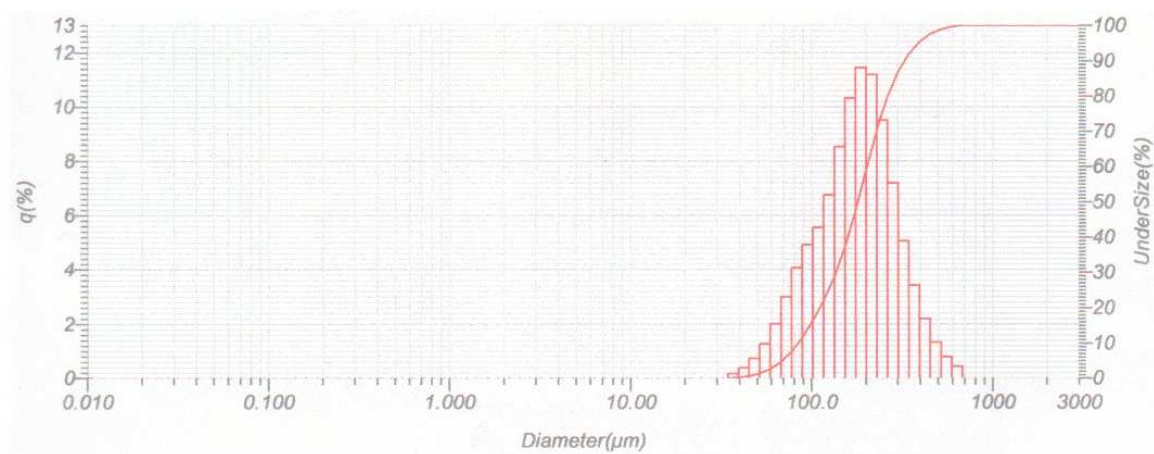
Velikost částic byla měřena v destilované vodě. Vzhledem k tomu, že částice musely být rozdispergovány v celém objemu, byla ke každému vzorku přidána kapka povrchově aktivní látky [37]. Výsledky měření jsou zapsány v tabulce 6.

Při měření byla dispergace vzorků prováděna pomocí ultrazvuku, neboť ibuprofen velice rychle tvořil agregáty. Avšak z tabulky 6 je patrné zmenšení velikosti částic původního vzorku z velikosti okolo 200 μm (Obrázek 13) na velikost pod 10 μm . Výjimkou jsou částice připravené při teplotě 40 °C a tlaku 250 bar, které měly velikost pod 100 μm . Avšak distribuční křivka (Obrázek 16b) obsahuje i malý podíl částic s velikostí pod 1 μm , což vede k předpokladu, že tyto částice nebyly před analýzou dobře rozdispergovány, což je patrné z příslušného SEM snímku (Obrázek 12e).

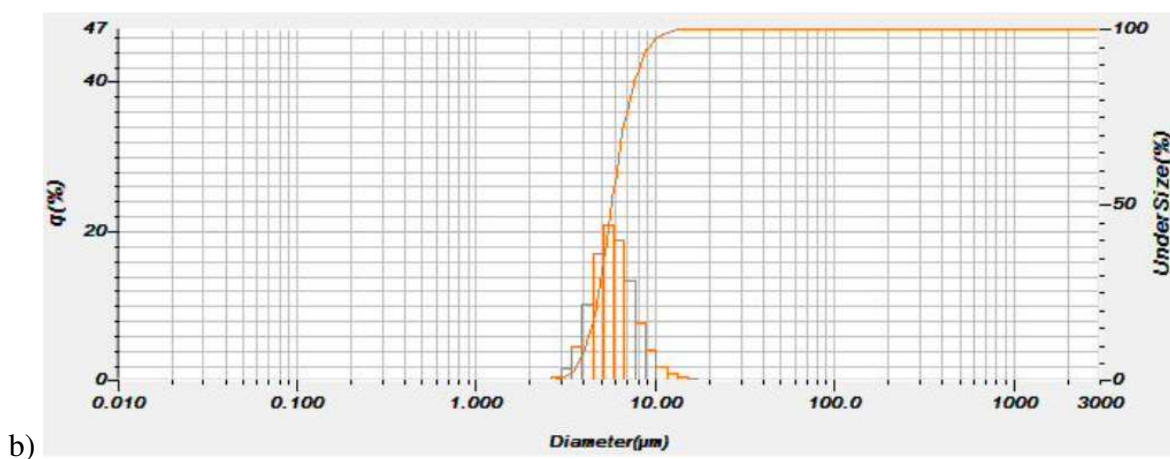
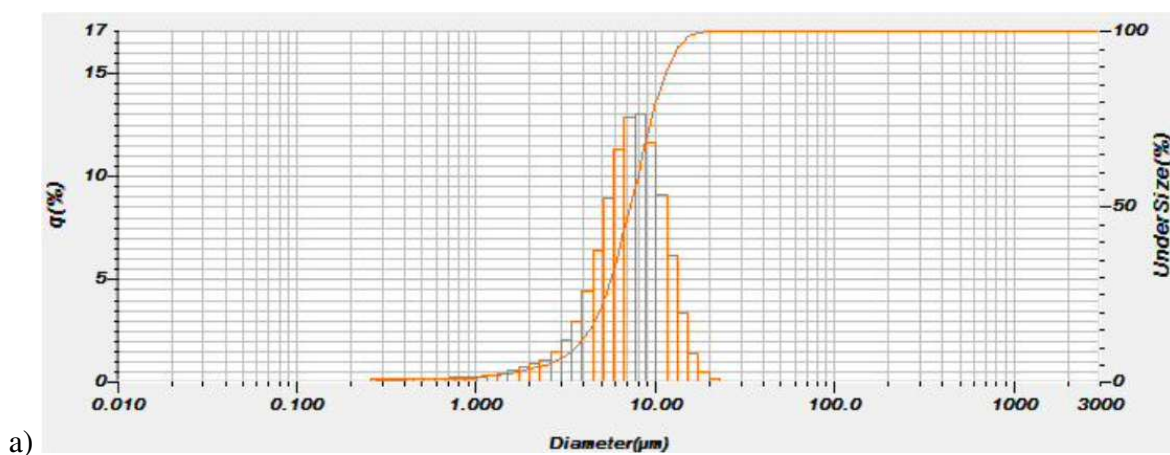
U částic připravených při tlaku 200 a 300 bar je patrné zmenšení částic při použití vyšší teploty. Tyto výsledky vykazují dobrou shodu se snímky SEM. Zároveň jsou distribuční křivky (Obrázek 14, 15) těchto vzorků jsou relativně úzké. Nejužší distribuci vykazují částice připravené při teplotě 35 °C a tlaku 300 bar (Obrázek 15a)

Tabulka 6: Velikost částic připravených za různých teplot a tlaků.

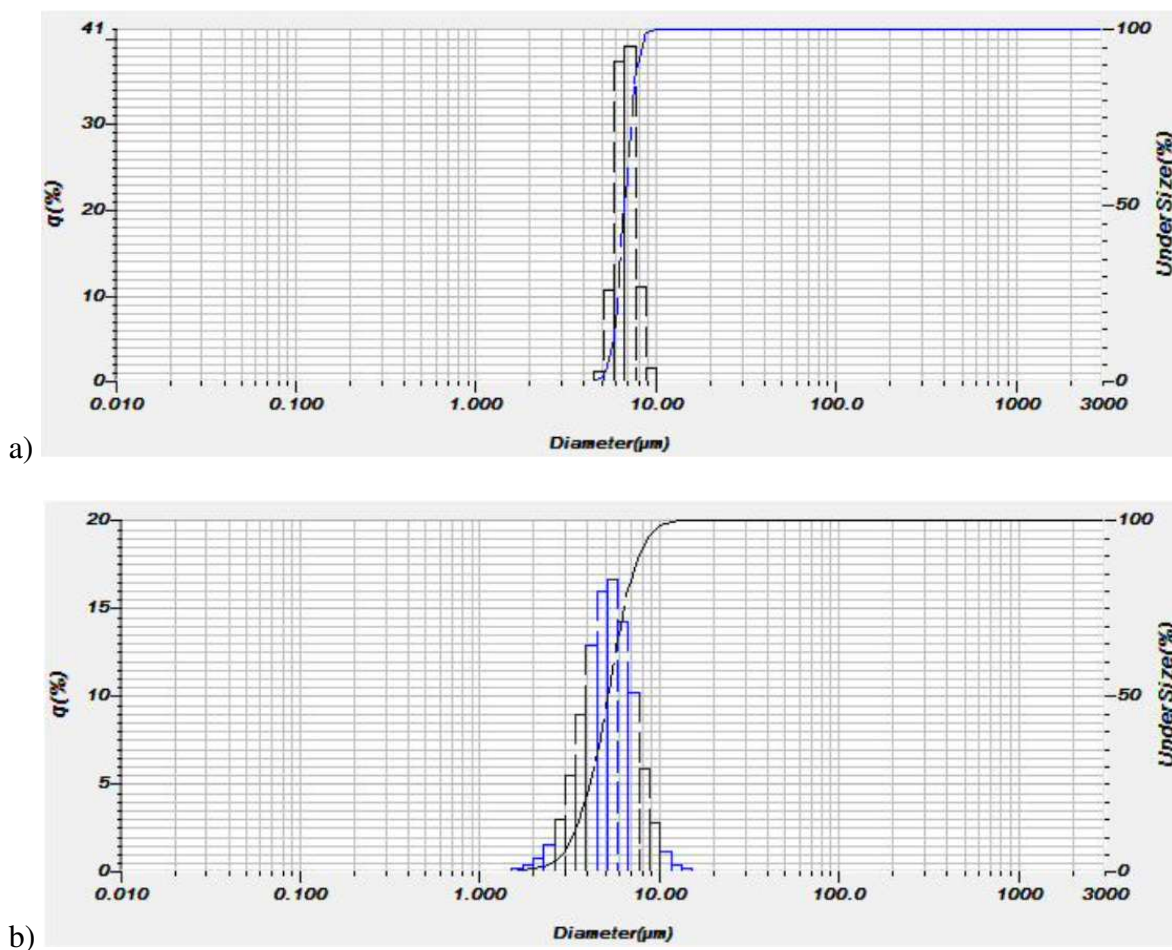
Vzorek	Teplota	Tlak	Střední velikost	Průměrná velikost	D10	D90
	°C	bar	μm	μm	μm	μm
IbuPuv	-	-	179,76	196,15	84,12	327,26
Ibu1	35	200	7,28	7,56	3,63	11,90
Ibu2	35	250	2,82	3,55	1,31	6,67
Ibu3	35	300	6,75	6,79	5,75	7,93
Ibu4	40	200	5,72	6,02	4,10	8,31
Ibu5	40	250	83,54	93,41	48,99	149,80
Ibu6	40	300	5,17	5,39	3,31	7,73



Obrázek 13: Distribuce velikost částic původního vzorku ibuprofenu.



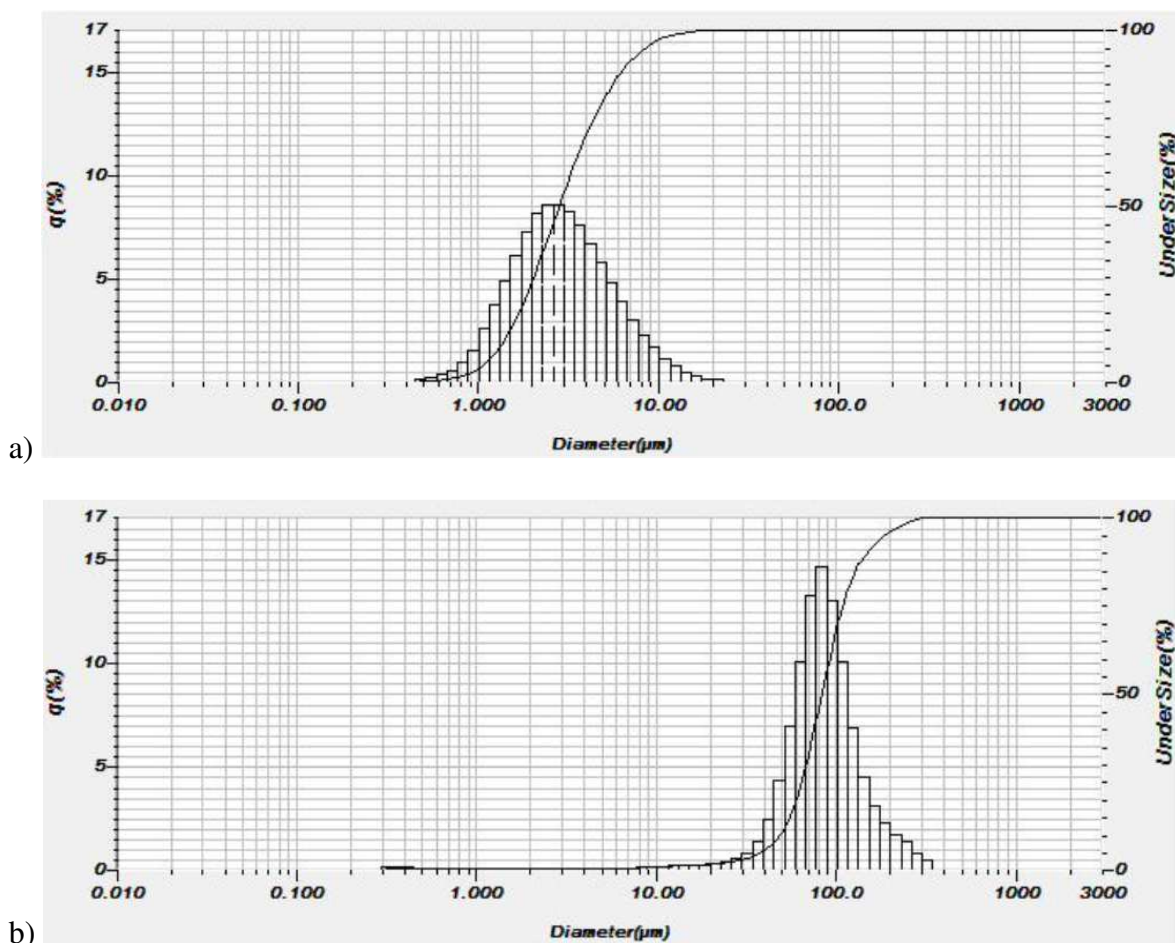
Obrázek 14: Distribuční křivky vzorků připravených při tlaku 200 bar a teplotě a) 35 °C
a b) 40 °C.



Obrázek 15: Distribuční křivky vzorků připravených při tlaku 300 bar a teplotě a) 35 °C
a b) 40 °C.

Částice připravené při teplotě 35 °C a tlaku 250 bar (Obrázek 16a) dosahují nejmenší velikosti částic. Naproti tomu částice připravené za stejného tlaku a při teplotě 40 °C (Obrázek 16b) dosáhly největší velikosti, avšak předpokládá se spíše jejich vysoká agregace při měření z důvodu neúplného rozdispergování vzorku.

Z výsledků jednoznačně vyplývá, že nedošlo oproti původnímu předpokladu k vytvoření submikronových částic a nanočástic ibuprofenu. Dosažené výsledky však korespondují s výsledky, které jsou prezentovány v dostupné vědecké literatuře, viz Teoretická část této diplomové práce. Možnou cestou k dalšímu snížení velikosti a stabilizaci vzniklých částic je jejich precipitace do kapalného dusíku. Následně je možné převést do takzvaného „suchého ledu“ („dry ice“), který obsahuje deionizovanou vodu a surfaktant (například polyethylenamid nebo polyvinyl pyrolidon) [34].

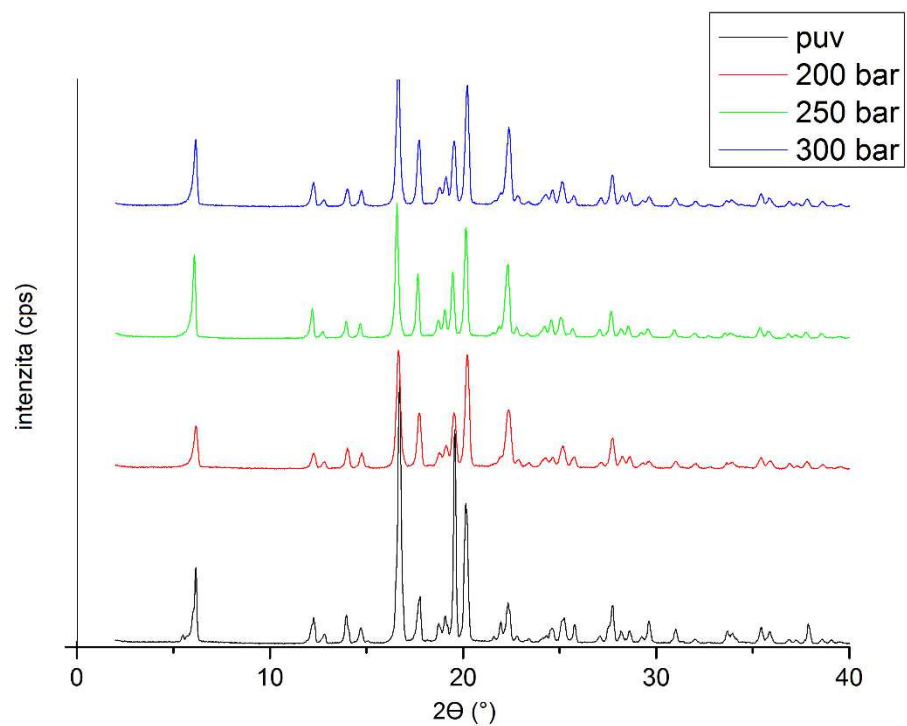


Obrázek 16: Distribuční křivky vzorků připravených při tlaku 250 bar a teplotě a) 35 °C
a b) 40 °C.

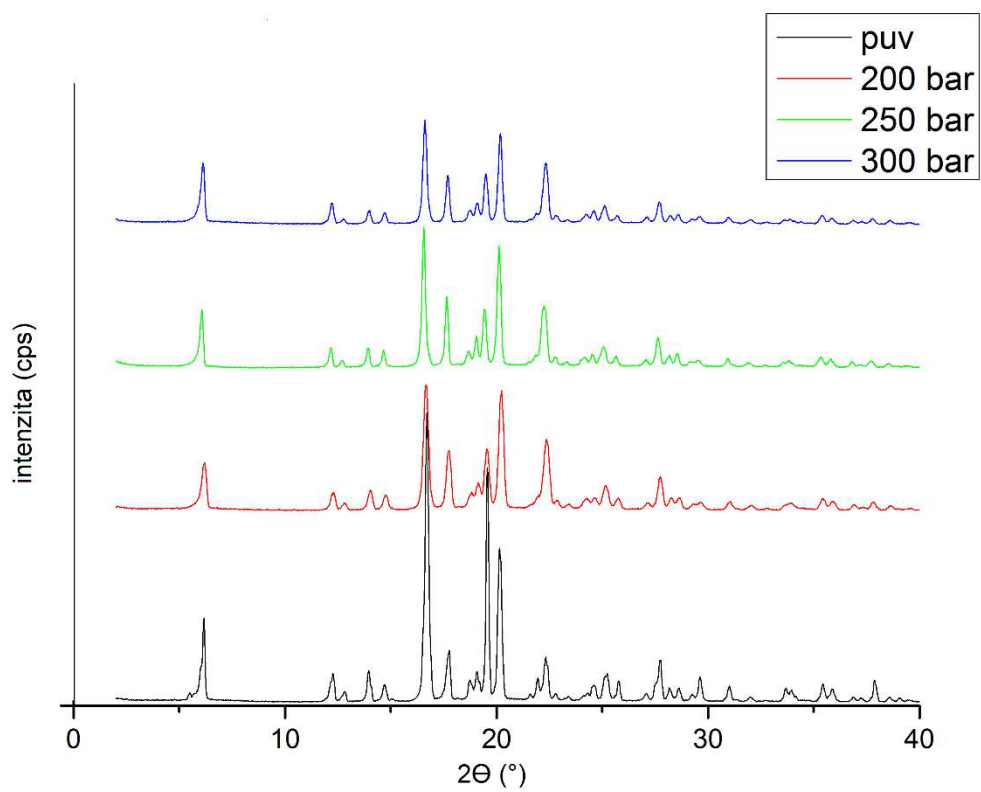
5.3 XRD

V Teoretické části je uvedeno, že hlavní rozdíly intenzity XRD prvního a druhého polymorfu ibuprofenu leží v úhlovém rozsahu 2θ od 15° do 25° . Tyto rozdíly jsou vyjádřeny v polohách píků a intenzitách vrcholů. Nicméně pokud se tyto polymorfy mísí, a to zejména v případě, že koncentrace prvního polymorfu dominuje, pak hlavní rozdíly jsou v redistribuci intenzit píků [17].

Z XRD snímků (Obrázek 17, 18) je patrné, že dochází k výraznému poklesu intenzity píků úhlů $16,5^\circ$ a ještě výraznějšímu poklesu v poloze $19,5^\circ$. Zároveň je patrný výrazný nárůst intenzity v poloze $22,5^\circ$. Poklesy intenzit potvrzují, že při použití superkritické technologie došlo ke zmenšení původních krystalů ibuprofenu. Tato redistribuce intenzit píků také může naznačovat pravděpodobný vznik druhého polymorfu, avšak se stálou dominancí prvního polymorfu.



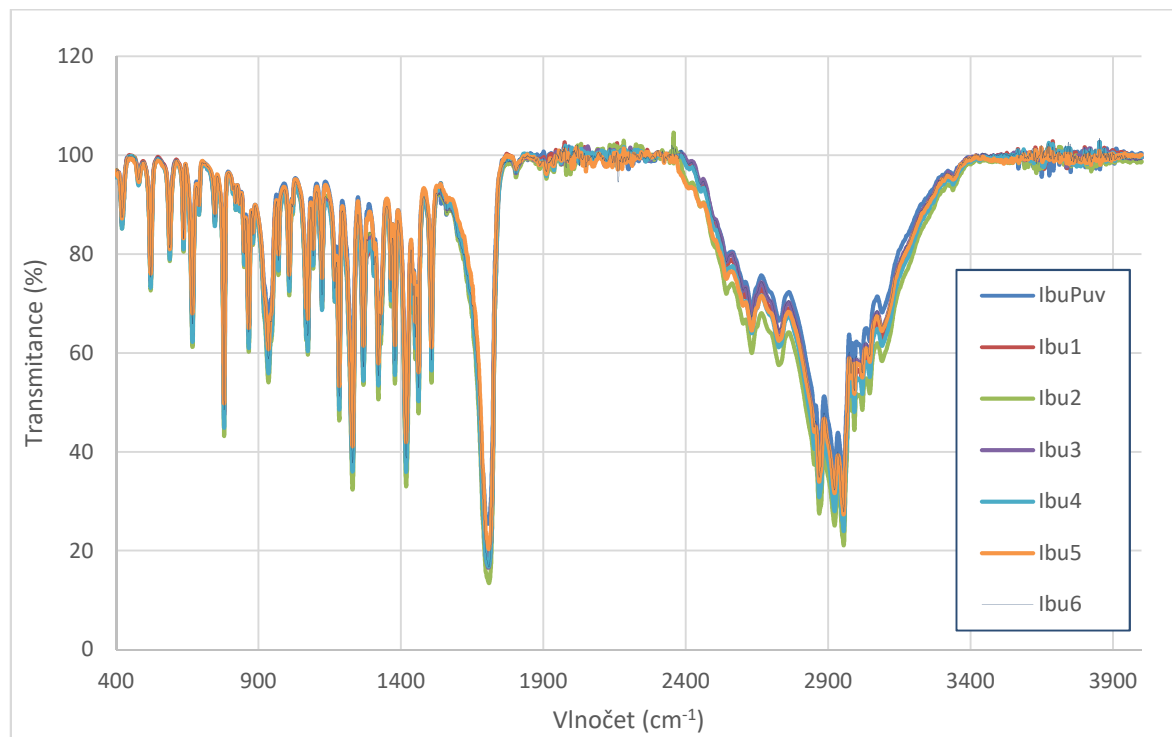
Obrázek 17: XRD záznam částic připravených při 35 °C.



Obrázek 18: XRD záznam částic připravených při 40°C.

5.4 FTIR

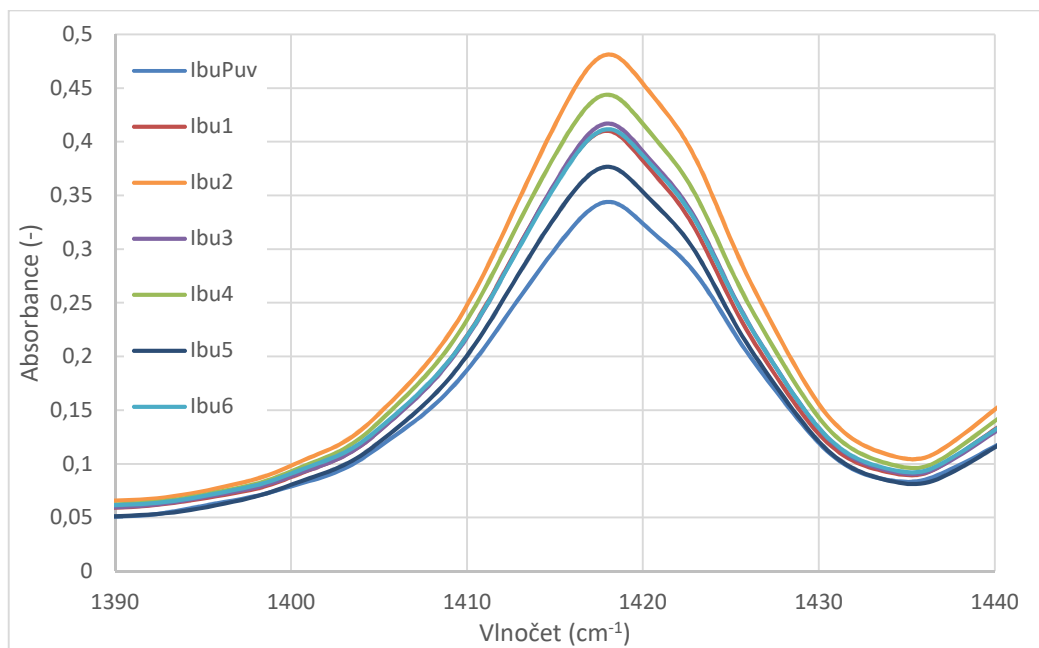
Na FTIR snímku záznamech v obrázku 19 je patrné, že všechny záznamy připravených vzorků ibuprofenu mají stejný průběh. Z toho lze usoudit, že se u žádného vzorku nemění vazebná struktura a nevznikají žádné nové látky.



Obrázek 19: FTIR záznam všech vzorků.

Spektrální pásmo, které leží ve vlnové délce v rozmezí 1392-1440 cm^{-1} (Obrázek 20) bylo vybráno pro analytické zhodnocení kvantitativních dat o příspěvku různých konformerů, které jsou rozpuštěny v CO_2 fázi. Hlavní přínos těchto vibrací patří benzenu [17].

U připravených vzorků lze pozorovat nárůst intenzity v oblasti vlnočtů 1392-1440 cm^{-1} oproti původnímu vzorku. Nejznatelněji právě pro vzorek Ibu2 připravený při teplotě 35 °C a 250 bar, u kterého vznikly nejmenší částice. To by mohlo být zapříčiněno pravděpodobnou změnou konformace tohoto vzorku, avšak pro potvrzení tohoto předpokladu by musely být provedeny ještě další analýzy jako jsou kvantové chemické výpočty a simulace molekulární dynamiky, které byly použity k podpoře přítomnosti dvou spektrálních příspěvků spojených s přítomností dvou konformací ibuprofenu ve studii [17].



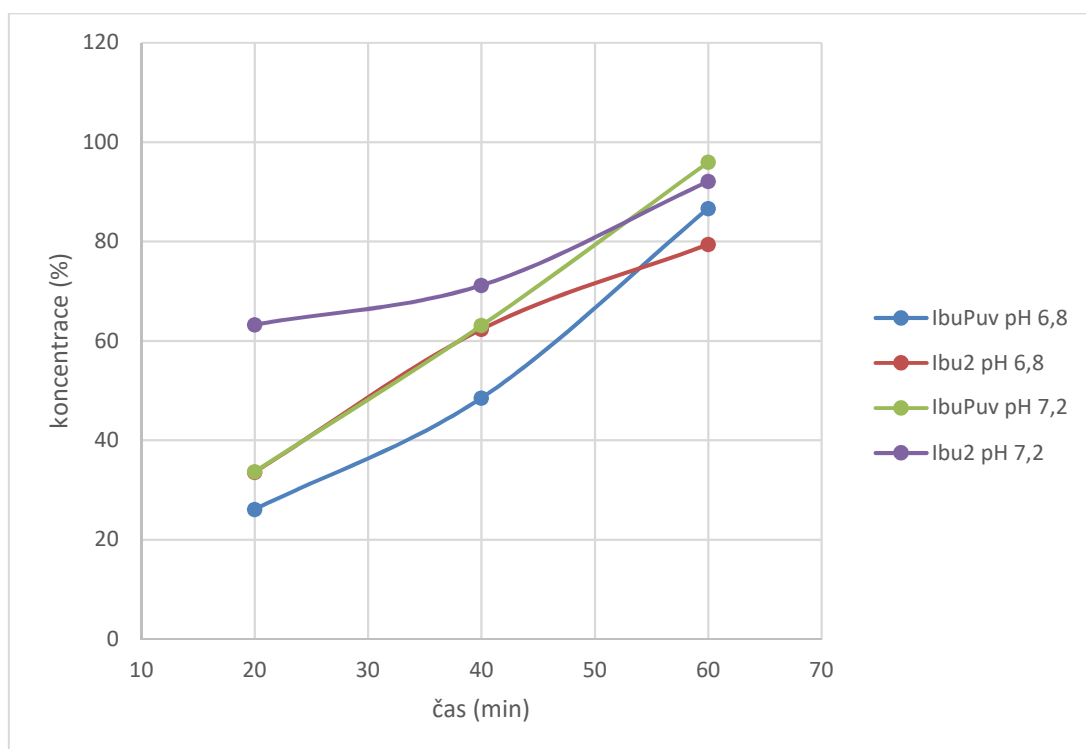
Obrázek 20: Absorbance vzorků v pásmu 1392-1440 cm^{-1} .

5.5 Rozpustnost

Pro porovnání rozpustnosti připravených částic ibuprofenu s původním vzorkem ibuprofenu byl vybrán vzorek Ibu2 připravený při teplotě 35 °C a 250 bar, který tvořil nejmenší částice. Z testů rozpustnosti (Tabulka 7, Obrázek 21) je patrný nárůst rozpustnosti u připraveného vzorku. Tento nárůst je mnohem výraznější pro vyšší hodnotu pH, zejména po prvních 20 minutách. Rozpustnost připraveného vzorku měřeného při pH 6,8 kopíruje rozpustnost původního vzorku ibuprofenu, avšak po jedné hodině vykazuje menší rozpustnost. Dále rozpustnost připravených vzorků je po jedné hodině nevýrazně nižší než rozpustnost původního vzorku, avšak v této fázi je ibuprofen téměř 100% rozpuštěn a získané výsledky mohou být rovněž zkresleny nejistotou měření UPLC analýzy, která se pohybuje kolem 10 %. Lze tedy říci, že rozpustnosti obou forem po 60 hodinách dosahují velmi podobných hodnot.

Tabulka 7: Výsledky testu rozpustnosti.

pH	6,8		7,2	
Vzorek	IbuPuv	Ibu2	IbuPuv	Ibu2
Čas (min)	Poměr naměřené a maximální koncentrace (%)			
20	26,14	33,60	33,72	63,30
40	48,55	62,34	63,11	71,19
60	86,66	79,42	95,96	92,10



Obrázek 21: Výsledky testu rozpustnosti.

5.6 Propustnost

Výsledky průměrných hodnot dvou testů propustnosti, které byly provedeny za stejných podmínek, jsou zaznamenány v tabulce 8. Při těchto testech byl původní vzorek (IbuPuv) porovnán s vybranými připravenými vzorky. Jednalo se o vzorky připravené při teplotě tlaku 200 bar a teplotě 35 °C (Ibu1) a při tlaku 250 bar a teplotách 35 °C a 40 °C (Ibu2, Ibu5).

Koncentrace vzorků C_0 na počátku byly mezi 16 a 34 mg/dm³. Permeabilita P_e a retenční hmota R byly vypočteny podle vzorců (2) a (3) z kap. 4.8. Procentuální permeabilita T a permeabilní koeficient p_{app} byly vypočteny podle následujících vzorců [28]:

$$T = 100 \cdot \frac{C_A \cdot V_A}{C_D \cdot V_D} \quad (5)$$

$$p_{app} = \frac{V_D \cdot V_A}{(V_D + V_R) \cdot S \cdot t} \cdot \ln \left[\frac{100 \cdot V_D}{100 \cdot V_D - T \cdot (V_D + V_R)} \right], \quad (6)$$

Permeabilita se pohybovala mezi $2,4 \cdot 10^{-6}$ - $3,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Retenční hmota je pro všechny vzorky téměř stejný. Procentuální permeabilita je 8,43-11,06 % a retenční koeficient je mezi hodnotou $3,3 \cdot 10^{-6}$ – $4,6 \cdot 10^{-6}$.

Z těchto výsledků je patrné, že permeabilita výsledných vzorků se téměř neliší od původního vzorku ibuprofenu. To podporuje předpoklad, že velikost částic nemá velký vliv na permeabilitu ibuprofenu, neboť ibuprofen patří do II skupiny BCS a je tedy přirozeně velmi permeabilní.

Zjištěné výsledky procentuální permeability T a permeabilního koeficientu p_{app} jsou 4krát menší než výsledky publikované ve studii provádějící rovněž testy s využitím PAMPA membrány [17]. V této studii však byl pro permeaci zvolen delší inkubační čas 17 h, což vedlo k vyšší permeaci ibuprofenu z donorové jamky do akceptorové. Inkubační doba 5 h, která byla použita v této diplomové práci, byla v souladu s pracovním postupem dle výrobce. Ten zároveň udává, že pokud je roztok přidán do donorové desky a pufr do akceptorové desky, pak pro $P_e > 1,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s je permeabilita vysoká a naopak pro $P_e < 1,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s je permeabilita nízká [38].

Tabulka 8: Výsledky testů rozpustnosti.

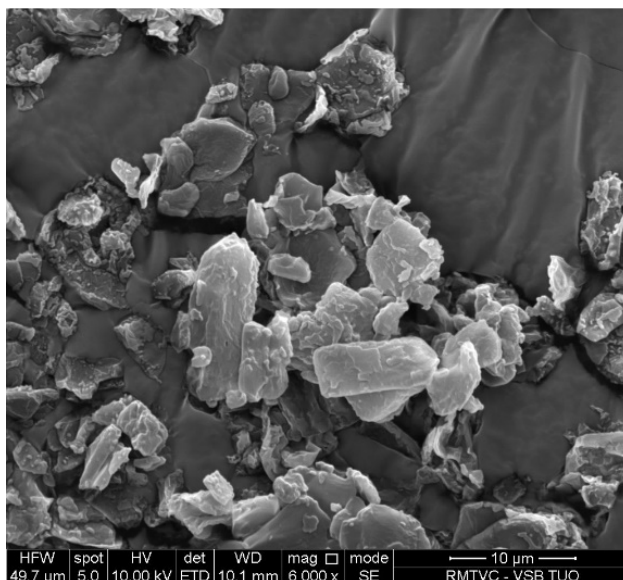
Vzorek	C_0	C_D	C_A	C_{eq}	P_e	R	T	p_{app}
	mg/dm ³				$\cdot 10^{-6}$ cm/s	-	%	$\cdot 10^{-6}$
IbuPuv	33,628	31,471	4,074	20,512	2,460	0,909	8,63	3,451
Ibu1	26,059	24,160	3,056	15,718	2,402	0,910	8,43	3,366
Ibu2	21,019	19,344	2,920	12,774	2,884	0,909	10,06	4,080
Ibu5	16,190	15,295	2,539	10,193	3,183	0,906	11,06	4,531

5.7 Využití kratší trysky

Závěrem práce byla použita kratší výstupní tryska (4 cm), která byla vyrobena zkrácením jedné z původních trysek. Částice byly připraveny za teploty 35 °C a 250 bar, neboť při těchto podmínkách dosahovaly připravené částice s využitím komerčně dodávané trysky nejmenší velikosti.

Tyto částice byly zatím charakterizovány pouze morfologicky SEM (Obrázek 22) a byla stanovena jejich velikost částic (Tabulka 9, Obrázek 23). Další testy budou předmětem budoucí práce.

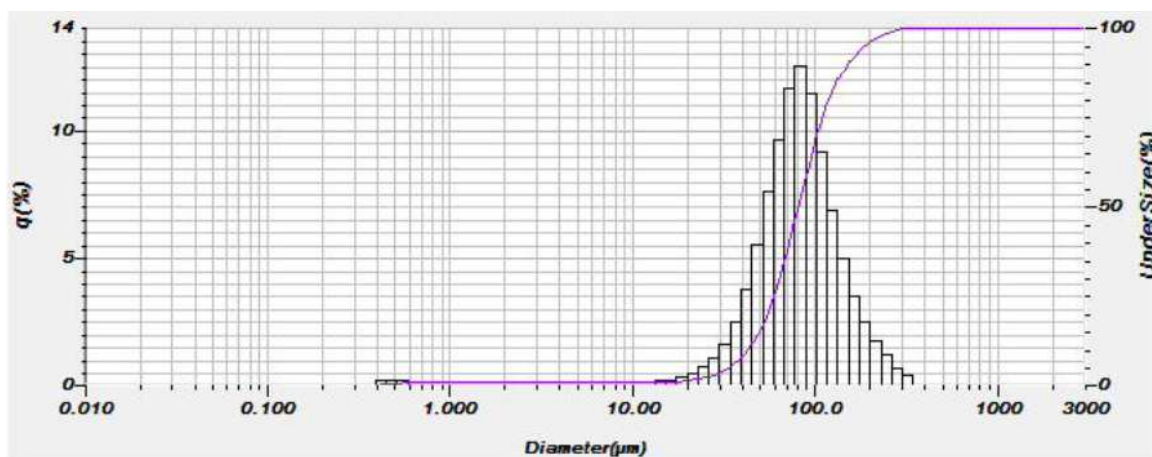
Výsledky ukázaly, že částice připravené s kratší restriční výstupní tryskou dosahovaly dle záznamu SEM velikosti pod 10 μm , což se nepotvrdilo u následného měření distribuce velikosti částic, kde částice dosahovaly velikosti pod 100 μm . Důvodem této neshody je opět pravděpodobná agregace výsledných částic a jejich neúplné rozdispergování jako při předchozím měření.



Obrázek 22: Vzorek ibuprofenu připravený kratší tryskou při teplotě 40 °C a tlaku 200 bar

Tabulka 9: Naměřené hodnoty PSD vzorku připraveného kratší tryskou.

Střední velikost (μm)	Průměrná velikost (μm)	D10 (μm)	D90 (μm)
81,34	91,29	43,10	151,71



Obrázek 23: Distribuční křivka vzorku připraveného kratší tryskou.

Z porovnání SEM částic s delší a kratší tryskou je patrné, že s kratší tryskou vznikaly větší částice, avšak podle výzkumu [32] by se měla jejich velikost zmenšovat. Tento rozpor vznikl pravděpodobně z důvodu větší tryskací vzdálenosti („spray distance“), která se zvýšila zkrácením jehly, neboť částice byly shromažďovány na stejně vzdálenou podložku v precipitační vialce.

6 Závěr

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu submikronových částic a nanočástic nesteroidního protizánětlivého léčiva ibuprofenu. V Teoretické části je popsán biofarmaceutický systém, na jehož základě jsou léčiva rozdělována dle jejich rozpustnosti a propustnosti a skupina nesteroidních protizánětlivých léčiv, zejména ibuprofen. Dále jsou popsány vlastnosti, které ovlivňují rozpustnost ibuprofenu, jako je jeho velikost částic, krystalická struktura nebo převedení do formy solí, případně deponace do různých nosičů.

Druhá část Teoretické části je věnována vlastnostem supekritických tekutin (SCFs) a možnostem jejich využití k mikronizaci částic. Mezi tyto metody patří rychlá expanze superkritické směsi, která je vhodná pro přípravu submikronových částic ibuprofenu. Dalšími metodami jsou metody GAS/SAS, které využívají SCFs jako tzv. anti-rozpouštědlo a jsou vhodné pro přípravu solí ibuprofenu. V neposlední řadě jsou v této části zmíněny parametry, které ovlivňují morfologii a velikost výsledných částic, jako je teplota, tlak nebo tvar výstupní trysky.

V praktické části této diplomové práce byly připraveny částice ibuprofenu metodou RESS pomocí komerčně vyráběného přístroje Spe-ed SFE 4. Morfologie, velikost částic a krystalová struktura byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), analýzou distribuce velikosti částic (PSD), rentgenovou difrakční analýzou (XRD) a infračervenou mikroskopií s Fourierovou transformací (FTIR).

Původní částice ibuprofenu s velikostí okolo 200 μm se podařilo zmenšit pod 10 μm . Bylo zjištěno, že při vyšší teplotě byly částice menší. Dále bylo zaznamenáno snížení velikosti částic při zvýšení tlaku z hodnoty 200 bar na hodnotu 250 bar a jejich opětovné zvětšení při zvýšení tlaku na hodnotu 300 bar. Avšak, oproti původnímu záměru, se nepodařilo připravit submikronové částice ibuprofenu, přestože některé vědecké práce tuto možnost ukázaly. Možnou cestou k jejich dalšímu zmenšení je jejich sběr do vhodného stabilizačního média, např. excipientu, neboť částice při převedení do vodného roztoku rychle agregovaly.

V dalším kroku byly provedeny testy rozpustnosti, při kterém byly částice ibuprofenu rozpouštěny ve vodných roztocích o pH 6,8 a 7,2 a byla sledována jejich koncentrace pomocí ultraúčinné kapalně chromatografie (UPLC) po 20, 40 a 60 min. Tyto testy prokázaly zvýšení rozpustnosti připravených mikročástic ibuprofenu ve srovnání

s původním vzorkem ibuprofenu. Zároveň potvrdily závislost rozpustnosti ibuprofenu na pH, která stoupala při zvýšení pH z hodnoty 6,8 na 7,2.

Důležitým krokem je provedení testů propustnosti s využitím zkoušky permeability paralelní umělou membránou (PAMPA). Tyto testy ukázaly, že permeabilita výsledných vzorků se téměř jen málo liší od původního vzorku ibuprofenu. To podporuje předpoklad, že velikost částic nemá velký vliv na permeabilitu ibuprofenu, neboť ibuprofen patří do II. skupiny BCS a je tedy přirozeně velmi permeabilní

Závěrem byly připraveny částice ibuprofenu metodou RESS, avšak za použití kratší výstupní trysky. Tyto částice byly prozatím charakterizovány jen morfologicky, avšak jejich další charakterizace bude předmětem budoucí práce. Ze SEM snímků částic připravených kratší tryskou je patrné, že jejím zkrácením vznikaly větší částice. Tento poznatek je v rozporu s literaturou, avšak pravděpodobným důvodem zjištěné skutečnosti je větší tryskací vzdálenosti („spray distance“), která se zvýšila zkrácením jehly, neboť částice byly shromažďovány na stejné vzdálenou podložku v precipitační vialce.

Výsledky diplomové práce ukázaly, že superkritická fluidní technologie v režimu RESS je vhodným prostředkem pro mikronizaci ibuprofenu i dalších léčiv. Přestože v případě ibuprofenu nedošlo k ovlivnění permeability přes umělou testovací membránu, byla prokázána vyšší rozpustnost, takže došlo ke zlepšení této vlastnosti významné z hlediska biodostupnosti. Připravené částice nedosáhly maximálního výtěžku v submikronových oblastech, kdy příčinou mohla být rychlá aglomerace částic na výstupu z expanzní cely. Další optimalizace bude předmětem pokračujícího výzkumu.

7 Citovaná literatura

- [1] ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015, **100**, s. 129-141. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.12.028. ISSN 08968446.
- [2] TÜRK, M. *Particle formation with supercritical fluids*. 1. b.r. ISBN 978-0-444-59486-0.
- [3] KHADKA, P.; Jieun R. O.; KIM, H. a kol. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, **9**(6), s. 304-316. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.05.005. ISSN 18180876.
- [4] KRATOCHVÍL, B.; SEILEROVÁ, L.; SLÁDKOVÁ, V. a ŠIMEK, M.. *Chemie a fyzika pevných léčiv*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-917-4.
- [5] KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S. a ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **420**(1), s. 1-10. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.032. ISSN 03785173.
- [6] BUER, J. Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology*. 2014, **22**(5), s. 263-267. DOI: 10.1007/s10787-014-0211-2. ISSN 0925-4692.
- [7] SU, C.-S. a CHEN, Y.-P. Measurement and correlation for the solid solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008, **43**(3), s. 438-446. DOI: 10.1016/j.supflu.2007.08.006. ISSN 08968446.

- [8] RANNOU, F.; PELLETIER, J.-P. a MARTEL-PELLETIER, J. Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2016, **45**(4), s. 18-21. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2015.11.007. ISSN 00490172.
- [9] SUCHÝ, D. a REICHL, M.. Moderní nesteroidní antirevmatika: klady a zápory. *Klin Farmakol Farm*. 2003, **17**, s. 166–169.
- [10] GEROČOVÁ, T. Ibuprofén očami současného lékárníka. *Praktické lékárnictvo*. 2012, **2**(2), s. 52-59.
- [11] ROZSYPAL, L. *Analýza léčiv v povrchových vodách*. Olomouc, 2010. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Petr Barták.
- [12] Ibuprofen. *Pubchem* [online]. b.r. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ibuprofen#section=Solubility>
- [13] DINESH, K.; WAGHMODE, A. a DHABALE, A. Solubility enhancement of ibuprofen using hydrotropic agents. *Int. J. of Pharm. & Life Sci* . 2011, **2**(2), s. 542-545.
- [14] Český lékopis 97. *Český lékopis 97* [online]. b.r. [cit. 2016-04-23]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>
- [15] SCHETTLER, T.; PARIS, S.; PELLETT, M.; KIDNER, S. a WILKINSON, D. Comparative Pharmacokinetics of Two Fast-Dissolving Oral Ibuprofen Formulations and a Regular-Release Ibuprofen Tablet in Healthy Volunteers. *Clinical Drug Investigation*. 2001, **21**(1), s. 73-78. DOI: 10.2165/00044011-200121010-00010. ISSN 1173-2563.

- [16] VELASCO, D.; DANOUX, Ch. B.; REDONDO, J. A.; ELVIRA, C.; SAN ROMÁN, J.; WRAY, P. S.; a S. G. KAZARIAN. PH-sensitive polymer hydrogels derived from morpholine to prevent the crystallization of ibuprofen. *Journal of Controlled Release*. 2011, **149**(2), s. 140-145. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.10.015. ISSN 01683659.
- [17] OPARIN, R. D.; IVLEV, D. V.; VOROBEL, A. M.; IDRISI A. a KISELEV, M. G.. Screening of conformational polymorphism of ibuprofen in supercritical CO₂. *Journal of Molecular Liquids*. 2016, , -. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.10.132. ISSN 01677322.
- [18] NOROOZI, J.; GHOTBI, S.; SARDROODI, J.; KARIMI-SABET, J. a ROBERT, M.. Solvation free energy and solubility of acetaminophen and ibuprofen in supercritical carbon dioxide: Impact of the solvent model. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **109**, s. 166-176. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.11.009. ISSN 08968446.
- [19] DUDOGNON, E.; DANÈDE, F.; DESCAMPS, M. a CORREIA, N. Evidence for a New Crystalline Phase of Racemic Ibuprofen. *Pharmaceutical Research*. 2008, **25**(12), s. 2853-2858. DOI: 10.1007/s11095-008-9655-7. ISSN 0724-8741.
- [20] MEZZOMO, N.; ROSSO COMIM, S.; CAMPOS C. a FERREIRA, S.. Nanosizing of sodium ibuprofen by SAS method. *Powder Technology*. 2015, **270**, s. 378-386. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.10.036. ISSN 00325910.
- [21] BAKHBAKHI, Y.; ALFADUL, S. a AJBAR, AH. Precipitation of Ibuprofen Sodium using compressed carbon dioxide as antisolvent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **48**(1-2), s. 30-39. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.10.013. ISSN 09280987.
- [22] REISER, S.; SUN, M.; JOHANNSEN M. a TÜRK, M. Influence of chemical nature of carrier materials on the dissolution behavior of racemic ibuprofen. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, , -. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.02.015. ISSN 08968446.

- [23] KITAK, T.; DUMIČIĆ, A.; PLANINŠEK, O.; ŠIBANC, R. a SRČIČ, S. Determination of Solubility Parameters of Ibuprofen and Ibuprofen Lysinate. *Molecules*. 2015, **20**(12), s. 21549-21568. DOI: 10.3390/molecules201219777. ISSN 1420-3049.
- [24] AL MASUM, A.; SHARMIN, F.; ISLAM, S. a REZA, S. Enhancement of Solubility and Dissolution Characteristics of Ibuprofen by Solid Dispersion Technique. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 2012, **11**(1), s. 1-6.
- [25] RIVERA-LEYVA, J. C.; GARCÍA-FLORES, M.; VALLADARES-MÉNDEZ, A.; OROZCO-CASTELLANOS, L. M.; a MARTÍNEZ-ALFARO, M. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **74**(4), s. 312-. DOI: 10.4103/0250-474X.107062. ISSN 0250-474x.
- [26] REDDY BATTU, P. a REDDY, M. S. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Ibuprofen in Tablets. *Asian J. Research Chem.* 2009, **2**(1), s. 70-72.
- [27] LI, S.; HE, H.; PARTHIBAN, L.; YIN, H. a SERAJUDDIN, A. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **94**(7), s. 1396-1417. DOI: 10.1002/jps.20378. ISSN 00223549.
- [28] SAVIĆ, J., DOBRIČIĆ, V.; NIKOLIC, K.; VLADIMIROV, S.; DILBER, S.; a BRBORIĆ, J. In vitro prediction of gastrointestinal absorption of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids using PAMPA technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **100**, s. 36-41. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.01.005. ISSN 09280987.

- [29] LUO, L.; PATEL, A.; SINKO, B.; BELL, M.; WIBAWA, J.; HADGRAFT, J. a LANE, M. A comparative study of the in vitro permeation of ibuprofen in mammalian skin, the PAMPA model and silicone membrane. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, **505**(1-2), s. 14-19. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.043. ISSN 03785173.
- [30] VACULIKOVA, E.; CERNIKOVA, A.; PLACHA, D.; PISARCIK, M.; DEDKOVA, K.; PEIKERTOVA, P.; DEVINSKY, F. a JAMPILEK, J. Cimetidine Nanoparticles for Permeability Enhancement. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016, **16**(8), s. 7840-7843. DOI: 10.1166/jnn.2016.12562. ISSN 15334880.
- [31] MARTÍN, A. a COCERO, M.J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, **60**(3), 339-350. DOI: 10.1016/j.addr.2007.06.019. ISSN 0169409x.
- [32] KAYRAK, D.; AKMAN, U. a HORTAÇSU, Ö. Micronization of Ibuprofen by RESS. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2003, **26**(1), s. 17-31. DOI: 10.1016/S0896-8446(02)00248-6. ISSN 08968446.
- [33] HEZAVE, A. a ESMAEILZADEH, F. Micronization of drug particles via RESS process. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010, **52**(1), 84-98. DOI: 10.1016/j.supflu.2009.09.006. ISSN 08968446.
- [34] SHARMA, S a JAGANNATHAN, R. High throughput RESS processing of sub-10nm ibuprofen nanoparticles. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **109**, s. 74-79. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.11.019. ISSN 08968446.
- [35] SOSNA, T. *Příprava nanočástic léčiv pomocí superkritické tekutiny*. Ostrava, 2014. Bakalářská práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava.

- [36] MONTES, A.; GORDILLO, M.D.; PEREYRA, C.; DE LOS SANTOS, D. M. a MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J. Ibuprofen–polymer precipitation using supercritical CO₂ at low temperature. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2014, **94**, s. 91-101. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.07.001. ISSN 08968446.
- [37] WHITE, E. a RASHID, A. DEVELOPMENT OF PARTICLE SIZING METHOD OF IBUPROFEN CRYSTALS USING MALVERN MASTERSIZER LASER LIGHT SCATTERING TECHNIQUE. *International Journal of Pharmaceutical Research and Innovation*. 2015, **8**, s. 29-33.
- [38] CHEN, K. The PAMPA Work Flow and Comparison of UV-Plate Reader Method vs. LC/MS Method. *BD Biosciences* [online]. b.r. [cit. 2017-05-1]. Dostupné z: https://www.bdbiosciences.com/documents/webinar_2009_08_pampa_work_flow.pdf